

Die Rolle des Zytokins Cardiotrophin-1 in der Herzinsuffizienz

Eine klinische und immunhistochemische Studie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von

Kristina Hilbig

geboren am 16.12.1977 in Nordhorn

Gutachter

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Für Hubert

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	American College of Cardiology
ACE	angiotensin converting enzyme
ADH	antidiuretisches Hormon
AHA	American Heart Association
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
APE/Ref-1	apurinic apyrimidine endonuclease redox factor 1
AT-1	Angiotensin-1
BMI	Body Mass Index
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BrdU	Bromodesoxyuridine
cDNA	copy-DNA
Ca	Calcium
CAR	Coxsackie Adenovirus Rezeptor
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CT-1	Cardiotrophin-1
DAB	Diaminobenzidin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUDP	Desoxyuridin-5`-Diphosphat
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	enzyme linked immunoassay
gp130	Glykoprotein 130
HCM	Hypertrophische Kardiomyopathie
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICM	Inflammatorische Kardiomyopathie
ISFC	International Society and Federation of Cardiology
ISEL	in situ nick end labelling
IL	Interleukin
JAK/STAT	Janus Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription

Abkürzungsverzeichnis

KHK	koronare Herzerkrankung
LIF	leukemia inhibitory factor
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
Mg	Magnesium
min.	Minuten
n	Anzahl der Patienten
NaOH	Natriumhydroxid
n.s.	nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RNA	Ribonucleinsäure
RVCM	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
sgp	soluble glycoprotein
Tab.	Tabelle
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TTG	Tissue Transglutaminase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated BrdU nick end labeling
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation
vs.	versus

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Allgemeine Aspekte der Herzinsuffizienz	3
2.2 Pathophysiologie und Klinik	3
2.3 Ursachen der Herzinsuffizienz	5
2.4 Kardiomyopathien	6
2.4.1 Dilatative Kardiomyopathie	6
2.4.2 Inflammatorische Kardiomyopathie	7
2.5 Bedeutung der Zytokine in der Pathogenese der Herzinsuffizienz	8
2.5.1 Allgemeine Aspekte	8
2.5.1 Rolle von Cardiotrophin-1 in der Pathogenese der Herzinsuffizienz	9
2.6 Bedeutung der Apoptose in der Herzinsuffizienz	10
2.7 Nachweis der Apoptose im Myokard	11
2.8 Therapie der Herzinsuffizienz	13
3 Zielstellung	14
4 Material und Methoden	15
4.1. Patienten – klinische Daten und Einteilungskriterien	15
4.2 BNP Bestimmung	15
4.3 Cardiotrophinmessung im Serum	16
4.4 TNF α und sgp130 Bestimmung	16
4.5 Gewebegewinnung und Aufarbeitung	16
4.5.1 Entnahme der Biopsie	16
4.5.2 Histologische Beurteilung und Enterovirusnachweis	17
4.6 Apoptosenachweis im Herzmuskelgewebe	17
4.6.1 Histochemische Gewebeaufbereitung	17
4.6.2 TUNEL-Färbung	18

Inhaltsverzeichnis

4.6.3 Transglutaminase-Färbung	19
4.6.4 Auswertung der Gewebeschnitte.....	19
4.6.5 Auswertung TUNEL-Färbung und Autofluoreszenzbetrachtung.....	20
4.6.6 Auswertung der Transglutaminase-Färbung.....	22
4.7 Statistische Analysen.....	23
5 Ergebnisse	24
5.1 Charakterisierung der Patienten.....	24
5.2 BNP als Herzinsuffizienzmarker	24
5.2.1 Generierung zweier Herzinsuffizienzgruppen anhand des BNP-Wertes.....	25
5.2.2 Sterblichkeitsrate in den Herzinsuffizienzgruppen I und II	27
5.3 TNF α in der Herzinsuffizienz	27
5.4 Cardiotrophin-1 in der Herzinsuffizienz.....	28
5.5 Der Rezeptor Glykoprotein 130 in der Herzinsuffizienz.....	29
5.6 Histochemischen Apoptosefärbungen	30
5.6.1 Ergebnisse der TUNEL-Methode	30
5.6.2 Ergebnisse der Transglutaminase-Färbung.....	32
5.7 Apoptoseindex im Vergleich zur Schwere der Herzinsuffizienz	33
5.7.1 Auswertung der Transglutaminase-Färbung.....	33
5.7.2 Auswertung der TUNEL-Methode	33
5.8 Zusammenhang zwischen Cardiotrophin-1 und Apoptose im Herzen	34
5.9 CT-1 in der Genese der Herzinsuffizienz: DCM versus inflammatorische Kardiomyopathie	35
5.10 Apoptoserate in der Herzinsuffizienz: DCM versus inflammatorische Kardiomyopathie	35
5.11 Ergebnisse der Enterovirusanalyse.....	36
5.11.1 Einfluss des Enterovirusstatus auf die Cardiotrophinexpression im Serum	36
5.11.2 Einfluss des Enterovirusstatus auf die Apoptose im Myokard	37
6 Diskussion	38
6.1 CT-1 und der Rezeptor gp130 in der Herzinsuffizienz	38

Inhaltsverzeichnis

6.2 CT-1 in seiner Wirkung als antiapoptotisches Zytokin	41
6.3 Apoptose in der Herzinsuffizienz und Diskussion der Methoden	44
6.4 CT-1 in der Genese der Herzinsuffizienz	47
7 Schlussfolgerungen	49
8 Literaturverzeichnis.....	50
Anhang	70

1 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz stellt in den westlichen Industrienationen einen bedeutsamen Morbiditäts- und Mortalitätsfaktor dar. Im Rahmen der Erkrankung kommt es durch eine erhöhte Druck- und Volumenbelastung zu einer kompensatorischen Hypertrophie des Herzmuskels, welche zu einer Dilatation und letztendlich einer Dekompensation des Herzens führen kann.

Der Nachweis eines in der Herzinsuffizienz vermehrt exprimierten Zytokins, dem aus der Interleukin-6 Gruppe stammenden Zytokin Cardiotrophin-1 (CT-1), ließ die Frage nach der Bedeutung dieses Zytokins in der Herzinsuffizienz aufkommen. Anhand von Zellkulturexperimenten an kardialen Myozyten konnte für Cardiotrophin-1 sowohl eine hypertrophierende als auch eine antiapoptotische und kardioprotektive Wirkung aufgezeigt werden. Wie auch die anderen Zytokine aus der IL-6 Familie übt Cardiotrophin-1 seine Wirkung über die Rezeptoruntereinheit Glykoprotein 130 (gp130) aus. Die hypertrophierende Wirkung von CT-1 führt vornehmlich zu einer Zunahme der Sarkomerenbildung in Reihen. Diese längsgerichtete Hypertrophie ließ die Vermutung aufkommen, dass das Zytokin CT-1 an der Entstehung einer Ventrikeldilatation in der Herzinsuffizienz beteiligt sein könnte. Auf der Grundlage dieser Befunde untersuchten wir in der vorliegenden Studie, inwiefern es eine Genexpression von Cardiotrophin-1 in der Herzinsuffizienz gibt, und ob diese mit dem Schweregrad oder der Pathogenese der Erkrankung korreliert. Im Weiteren gingen wir der Fragestellung nach, auf welche Weise die antiapoptotische Wirkung des Zytokins in der Herzinsuffizienz zum Tragen kommt.

In unserer Untersuchung waren insgesamt 138 Patienten mit einer mehr oder weniger schweren Herzinsuffizienz (NYHA-Klassen I bis IV) eingeschlossen. Bei 86 Patienten der Studie konnte histologisch die Diagnose einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) und bei 27 Patienten die Diagnose einer chronischen Myokarditis gestellt werden. Zur besseren Objektivierung des Schweregrades der Herzinsuffizienz wurde das BNP im Serum der Patienten bestimmt und eine Einteilung anhand des BNP Wertes in eine leichte ($\text{BNP} < 50 \text{ pg/ml}$) und eine schwere ($\text{BNP} > 1000 \text{ pg/ml}$) Herzinsuffizienz vorgenommen.

Wir konnten zeigen, dass Cardiotrophin-1 zusammen mit dem Rezeptor gp130 mit zunehmendem Schweregrad der Herzinsuffizienz vermehrt im Serum exprimiert wird. Das Ausmaß der CT-1 Expression ist dabei nicht assoziiert mit der Pathogenese der Herzinsuffizienz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Apoptoserate der Herzmuskelzellen anhand der Apoptosemarker Transglutaminase und TUNEL bestimmt. Die durch eine Myokardbiopsie gewonnenen Proben von 92 Patienten wurden nach der immunhistochemischen Färbung lichtmikro-

skopisch analysiert und die Ergebnisse mit der jeweiligen CT-1 Expression im Serum verglichen. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Apoptose im Myokard und den CT-1 Werten im Serum der Patienten. Wir konnten jedoch zeigen, dass mit zunehmender Schwere der Herzinsuffizienz eine signifikant erhöhte Apoptoserate der Kardiomyozyten nachweisbar ist. Die Expression von CT-1 wie auch das Vorkommen der Apoptose im Herzen scheinen daher vor allem durch eine in der Herzinsuffizienz erhöhte Volumenbelastung des Ventrikels bestimmt zu sein. Inwieweit in diesem Zusammenhang eine direkte antiapoptotische Wirkungsweise des Zytokins zum Tragen kommt, gilt es weiter zu untersuchen. Eine in unserer Untersuchung bei schwer herzinsuffizienten Patienten ebenfalls signifikant erhöhte Expression des apoptotisch wirkenden Zytokins TNF α deutet auf eine Interferenz der Zytokine hin, die eine Beurteilung einzelner Signalwege in unserem Studienaufbau kaum zulässt.

Die Sterblichkeit der Patienten mit einer schweren Herzinsuffizienz zeigte sich signifikant erhöht. In Anbetracht der stark erhöhten CT-1 Werte im Serum eben dieser Patientengruppe könnte sich für das Zytokin somit auch eine prognostische Wegweisung abzeichnen.

Vieles spricht dafür, dass die verstärkte CT-1 Expression über eine hypertrophierende Wirkung zur Aufrechterhaltung der erforderlichen Pumpleistung des Herzmuskelgewebes beiträgt. Welche Rolle dem Zytokin bei der folgenden Progression der Herzinsuffizienz zuteil wird bleibt offen und ist weiterhin Gegenstand einer kontrovers diskutierten wissenschaftlichen Debatte.

Bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit muss berücksichtigt werden, dass unser Patientenkollektiv nur aus Herzinsuffizienzkranken bestand und wir über kein gesundes Kontrollkollektiv verfügten. Eine Vielzahl von in vivo und insbesondere im kranken Organismus ablaufender Regelkreise erschwert die Beurteilung einzelner Faktoren in unserer Studie erheblich. Nicht zuletzt trägt diese Arbeit jedoch zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie und der zellulären Prozesse, insbesondere auf der Ebene der Zytokine, im Verlauf der Herzinsuffizienz bei.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Aspekte der Herzinsuffizienz

Der Begriff “Herzinsuffizienz“ charakterisiert einen Krankheitszustand unterschiedlicher Ätiologie, bei welchem das Herz trotz eines ausreichenden venösen Angebots nicht in der Lage ist, die vom peripheren Gewebe benötigte Blutmenge zu fördern. Klinisch ist die Erkrankung vor allem durch eine Dyspnoe und Leistungsabnahme gekennzeichnet (The Task Force on Heart Failure of the European Society of Cardiology 1995, Erdmann und Böhm 1996, Katz 2002).

Die Herzinsuffizienz ist in Europa mit einer Prävalenz von 0,4 – 2 % eine häufige Erkrankung (Dominguez et al. 1999). Veränderte Altersstrukturen der Bevölkerung und verbesserte Überlebenschancen durch medizinischen Fortschritt haben wesentlich zu der erhöhten Inzidenz einer chronischer Herzinsuffizienz beigetragen (Hoes et al. 1998). Das Vorkommen der Erkrankung steigt von < 1 % bei 45 – 55-Jährigen auf ungefähr 10 % bei 80-Jährigen (Hoppe und Erdmann 2001, Hobbs und Boyle 2002, Hess 2003). Dabei ist die Inzidenz der Herzinsuffizienz bei Männern annähernd doppelt so hoch wie bei Frauen (Cowie et al. 1999). Im Gegensatz zum Herzinfarkt nimmt die Häufigkeit der Herzinsuffizienz deutlich zu. Die durchschnittliche Inzidenz in der Bevölkerung liegt derzeit bei 0,5 – 1 %. In der Altersgruppe der über 80-Jährigen liegt die jährliche Inzidenz pro 1000 Einwohner zwischen 25 und 30 Fällen. Die Sterblichkeit bei symptomatischer Herzinsuffizienz beträgt nach 5 Jahren etwa 50 – 70 %. Bei höhergradiger Herzinsuffizienz liegt sie heute pro Jahr bei 20 % (Böhm 2002). Die Erkrankung weist damit eine schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate als viele maligne Tumore auf (Stewart et al. 2001) und stellt somit ein medizinisches und gesundheitspolitisches Problem ersten Ranges in den Industrieländern dar.

2.2 Pathophysiologie und Klinik

Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz ist geprägt von einer verminderten Herzleistung. Ein verringertes Herzminutenvolumen, meist aufgrund einer Kontraktionsschwäche, führt zu erhöhten Füllungsdrücken, aus denen später ein sogenanntes Rückwärtsversagen resultiert. Im weiteren Verlauf nimmt dann das Herzzeitvolumen ab und es kommt, zunächst nur unter Belastung, zum sogenannten Vorwärtsversagen. Der Abnahme der Herzleistung folgen Kompensationsmechanismen wie beispielsweise die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (Cohn et al., 1981). Diese Kompensations-

mechanismen tragen anfangs dazu bei, eine adäquate Kreislautsituation aufrechtzuerhalten. Langfristig führt die vermehrte Freisetzung dieser Botenstoffe über eine Erhöhung der Nachlast und der Herzfrequenz sowie der Beeinflussung des Remodelingvorgangs zu einer Progression der Erkrankung (Braunwald 1994, Gerdes und Capasso 1995).

Unter der permanenten Druck- und Volumenbelastung kommt es zu einer kompensatorischen Hypertrophie des Herzmuskels bzw. der einzelnen Kardiomyozyten (van Heugten und Lamers 1997, Wollert und Chien 1997). Dies führt anfangs zu einer erhöhten Kraftentwicklung. Mit zunehmendem Ausmaß der Hypertrophie kann aufgrund der mangelnden Zunahme der Kapillardichte die Sauerstoffversorgung der Myozyten jedoch nicht mehr gewährleistet werden (Francis 1991). Der Untergang einzelner Myokardzellen und deren Ersatz durch narbiges Bindegewebe führt zu einer myogenen Gefügedilatation des Herzen (Drexler et al. 1992). Durch die Ventrikeldilatation sind die Sarkomere der Herzmuskelzellen maximal verlängert, was in einer abgeflachten und nach unten verschobenen Frank-Starling-Kurve resultiert (Packer 1996). Eine Erhöhung des enddiastolischen Volumens vermag nun nicht mehr zu einer Erhöhung der Auswurfleistung beizutragen. Als weitere Komplikation kann es über eine Dilatation der Vorhöfe und Klappenringe mit einer konsekutiven Klappeninsuffizienz und einer absoluten Arrhythmie zu einer Dekompensation des Herzens kommen.

Die Herzinsuffizienz wird nach der Schwere der klinischen Symptome anhand der NYHA (New York Heart Association)-Klassifikation eingeteilt.

Sie beruht auf dem subjektiven Symptom der Atemnot und wird dementsprechend unterteilt in:

Tab. 2.2: NYHA-Klassifikation

NYHA I	keine Atemnot, asymptomatisch	Herzerkrankung ohne physische Einschränkung
NYHA II	Milde Atemnot bei Belastung, keine Ruhesymptomatik	Leichte Herzinsuffizienz
NYHA III	Deutliche Atemnot bei Belastung, eine leichte Anstrengung erzeugt bereits Symptome	Mittelschwere Herzinsuffizienz
NYHA IV	Atemnot im Ruhezustand	Schwere Herzinsuffizienz

Das American College of Cardiology (ACC) und die American Heart Association (AHA) veröffentlichten im Jahre 2001 eine erweiterte Klassifikation der Herzinsuffizienz in den Sta-

dien A bis D. Diese ergänzt die NYHA-Klassifikation dahingehend, dass neben den klinischen Symptomen auch strukturelle Veränderungen des Herzens beurteilt werden. Berücksichtigt werden dabei auch die asymptomatischen Patienten, die aufgrund adaptiver Mechanismen noch keine Symptome einer Herzinsuffizienz aufweisen, bei denen jedoch das Risiko der Entwicklung derselben bereits besteht (Hunt et al. 2001).

Um das Ausmaß der Herzinsuffizienz objektiver erfassen zu können, kann im Blut der Patienten das natriuretische Peptid vom Typ B (Brain Natriuretic Peptide, BNP) bestimmt werden. BNP wurde 1988 erstmals im Gehirn von Schweinen entdeckt, in nachfolgenden Studien konnte allerdings aufgezeigt werden, dass der Ventrikel mit 60 – 80 % die Hauptquelle der kardialen BNP Sekretion darstellt (Mark und Felker 2004). Das Protein wird überwiegend als Reaktion auf eine Volumenbelastung der Ventrikel aus Membrangranuli freigesetzt. BNP besitzt wie ANP sowohl natriuretische als auch diuretische Eigenschaften, und fungiert somit als Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Systems (Adams et al. 2003).

Studien haben gezeigt, dass die Konzentration an zirkulierendem BNP mit dem Schweregrad einer Herzinsuffizienz gemäß der NYHA-Klassifikation zunimmt (Maisel 2001, Wieczorek et al. 2002, Luchner et al. 2003). Eine Erhöhung der Plasmakonzentration von BNP kann dabei schon im frühen Verlauf der Herzinsuffizienz (Stadium NYHA I) nachgewiesen werden.

2.3 Ursachen der Herzinsuffizienz

Die häufigste Ursache für die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz ist heute die koronare Herzkrankheit. Ein weiterer bedeutender Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz stellt die arterielle Hypertonie dar (Daten der Framingham-Studie, Kannel et al. 1988).

Ursächlich an dritter Stelle stehen die Kardiomyopathien, sowie des Weiteren Fehler der Herzklappen, Septumdefekte und Herzrhythmusstörungen (Cowie et al. 1999, Böhm 2002).

2.4 Kardiomyopathien

Die klinisch-pathophysiologische Einteilung nach der WHO/ISFC Task Force (Richardson et al. 1996) unterscheidet Kardiomyopathien als primäre Herzmuskelerkrankungen, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen, nach ihrem klinischen Phänotyp, d.h. nach ihrer Hämodynamik und ihrer makroskopischen Anatomie in folgende fünf Formen:

- dilatative Kardiomyopathie (DCM)
- hypertrophische Kardiomyopathie (HCM)
- restriktive Kardiomyopathie (RCM)
- arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (RVCM)
- nicht klassifizierbare Kardiomyopathien

Zur Sicherung der klinischen Diagnose einer Kardiomyopathie stellt die Endomyokardbiopsie eine wichtige diagnostische Methode dar (Erdmann et al. 1980, Richardson 1980, Maisch et al. 1988, Hufnagel et al. 2000, Felker et al. 2000).

Im Folgenden sollen die pathologischen Prozesse der Herzinsuffizienz bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie bzw. einer inflammatorischen Kardiomyopathie näher betrachtet werden.

2.4.1 Dilatative Kardiomyopathie

Unter den Kardiomyopathien stellt die idiopathische dilatative Kardiomyopathie (DCM) die größte Untergruppe dar. Nach einer 1999 veröffentlichten Studie zur Inzidenz und Ätiologie der Herzinsuffizienz (Cowie et al. 1999) kann in ca. 17 % eine DCM als primäre Ätiologie einer Herzinsuffizienz angenommen werden. Die Herzinsuffizienz bei der dilatativen Kardiomyopathie entwickelt sich langsam. Männer sind mit einem Verhältnis von 3:1 bevorzugt betroffen. Die Erstdiagnose wird im mittleren bis höheren Lebensalter gestellt, wobei jedoch auch Jugendliche erkranken können (Felker et al. 2000). Nach dem Auftreten klinischer Symptome einer Herzinsuffizienz ist die Prognose der Erkrankung mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Mortalität von 20 % ungünstig (Olbrich 2001). Komplikationen stellen Arrhythmien, Thromboembolien und der plötzliche Herztod dar.

Nach der Definition der WHO von 1995 kann die Diagnose einer idiopathischen DCM erst nach Ausschluss anderer zu einer Dysfunktion des Herzmuskels führenden ursächlichen Erkrankungen gestellt werden (Richardson et al. 1996).

Für die ätiopathogenetisch bekannten sekundären Formen der dilatativen Kardiomyopathie werden Ursachen wie Virusinfektionen (Martino et al. 1994, Schwaiger et al. 1993, Wessely

et al. 1998b, Pauschinger et al. 1999), Speicherdefekte, endokrine Störungen, toxische Genesen (Fernandez-Sola et al. 1994, McKenna et al. 1998) und autoimmunologische Prozesse (Maisch, 1989, Bouhour et al. 1993) diskutiert. Bei 20 – 30 % der an einer Kardiomyopathie Erkrankten kann eine familiäre Genese nachgewiesen werden.

Hämodynamisch im Vordergrund steht bei der DCM ein systolischer Pumpfehler. Im Endstadium der Erkrankung weist das Herz eine Gewichtszunahme sowie eine Dilatation der Ventrikel und Atriae auf. Eine begleitende Störung der diastolischen Funktion tritt dann regelhaft hinzu.

Das histologische Bild ist durch eine Fibrose des Myokards und einer Hypertrophie, aber auch Atrophie der Myozyten charakterisiert. Man findet vorwiegend eine chronische Degeneration mit Verlust von kontraktile Elementen, Desorganisation von Komponenten des Zytoskeletts wie Desmin und Tubulin sowie eine Vermehrung von Membran-assoziierten Proteinen (Schaper et al. 1991). Die Umorganisation der Herzmuskelzellen führt zu einer Verschlechterung der myokardialen Sauerstoffversorgung. In diesem hypoxischen Stadium kann es unter anderem durch den Einfluss von Zytokinen zu einer vermehrten Apoptose kommen, welche zum Verlust an Myozyten beiträgt (Schaper et al. 1999).

2.4.2 Inflammatorische Kardiomyopathie

Nach der WHO/ISFC Task Force von 1995 stellt die inflammatorische Kardiomyopathie, definiert als chronische Myokarditis mit kardialer Dysfunktion, eine Untergruppe der dilatativen Kardiomyopathien dar. Die inflammatorische Kardiomyopathie ist durch den Nachweis einer intramyokardialen Entzündung in Endomyokardbiopsien von Patienten mit dem Bild einer DCM definiert (Richardson et al. 1996). Der Nachweis von mehr als 14 infiltrierenden Leukozyten (T-Lymphozyten und Makrophagen) pro mm² gilt dabei als pathognomisch (Maisch et al. 2000). Wie bei der akuten Myokarditis werden idiopathische, autoimmune und infektiöse Formen der entzündlichen Kardiomyopathie unterschieden. Der Nachweis eines Erregers in der Endomyokardbiopsie mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), Slot-Blot oder In-situ-Hybridisierung stellt ein bedeutendes pathogenetisches Kriterium dar (Bowles et al. 1986, Kandolf et al. 1993, Pauschinger et al. 1999). Je nach Erreger unterscheidet man etwa virale, bakterielle, spirochätale, protozoale und parasitäre Myokarditiden. In den industrialisierten Ländern wird als häufigste Ursache für eine Myokarditis eine Virusinfektion angesehen, wobei wahrscheinlich alle humanpathogenen Viren eine Myokarditis hervorrufen können. Neben Parvovirus B19, Zytomegalieviren, Enteroviren und Adenoviren konnten Herpes-simpex-Typ-2-Viren, Epstein-Barr-Viren und Influenzaviren nachgewiesen werden, wobei Coxsackieviren der Gruppe B die größte Bedeutung zuteil wird (Woodruff 1980, Feldman und Mc-

Namara 2000, Maisch et al. 2003). Zudem hat als Verursacher einer Myokarditis in den letzten Jahren das human-immunodeficiency-virus (HIV) zugenommen (Calabrese et al. 2003).

Epidemiologische Ergebnisse lassen vermuten, dass die Viruspersistenz zur Pathogenese entzündlicher Herzmuskelerkrankungen beitragen kann (Kandolf et al. 1993, Kandolf 1998, Wessely et al. 1998b, Hufnagel et al. 2000).

Hinsichtlich der Entwicklung einer Herzinsuffizienz aus einer viralen Myokarditis werden mehrere Pathomechanismen diskutiert (Maisch et al. 2002b):

1. Durch die initiale Virusinfektion kommt es zu vereinzelt Schäden an Herzmuskelzellen, wobei die so freigelegten Zellstrukturen eine Autoimmunantwort triggern. Die Verwandtschaft zwischen Oberflächenantigenen von Viren und Herzmuskelzellen führt so zu einer Aktivierung des Immunsystems (Crossreaktion) mit nachfolgendem Untergang kardialer Zellen (Rose et al. 1993).
2. Eine direkte Zerstörung der Myozyten durch etwa Cocksackieviren erfolgt unter Bindung an den Cocksackie Adenovirus Rezeptor (CAR) (McManus et al. 1993, Bewley et al. 1999).
3. Durch die Persistenz viraler Proteasen kommt es zur Zerstörung des Zytoskeletts (Wessely et al. 1998a).

2.5 Bedeutung der Zytokine in der Pathogenese der Herzinsuffizienz

2.5.1 Allgemeine Aspekte

Wie die klinische und experimentelle Forschung der letzten 10 - 15 Jahre gezeigt hat, spielt die Regulation der Zytokine eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz (Staudt et al. 2002, Baumgarten et al. 2004).

Erstmals 1990 beobachteten Levine et al. eine signifikante Erhöhung der Gesamtkonzentration des Zytokins TNF α (Tumor Nekrose Faktor α) bei Patienten mit hochgradiger Herzinsuffizienz (Levine et al. 1990). In neueren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass dieses Signalprotein direkt im Herzen exprimiert wird und neben einem negativ inotropen und chronotropen Effekt am Herzen auch zur vermehrten Fibrose und Apoptose führen kann (Krown et al. 1996, Torre-Amione et al. 1996, Oral et al. 1997).

Ähnlich konnte für das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) nachgewiesen werden, dass es im Rahmen einer Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert wird (Anker et al. 1997, Tsutamoto et al. 1998). Zu den multiplen Funktionen dieses Zytokins wird eine hypertrophierende und antiapoptotische Wirkung auf die Myozyten (McGowan et al. 2003) als auch eine Beeinflussung der Immunmodulation gezählt (Kishimoto 2005).

2.5.1 Rolle von Cardiotrophin-1 in der Pathogenese der Herzinsuffizienz

Aufgrund seiner hypertrophen und antiapoptotischen Wirkung erlangte das Zytokin CT-1 mit seinem Signalweg über den Rezeptor gp130 bei der Frage nach der Entstehung der Herzinsuffizienz zunehmende Bedeutung (Hunter und Chien 1999, Bristow und Long 2002).

Cardiotrophin-1 (CT-1) gehört zu den Zytokinen der Interleukin-6 Familie. Zu dieser Gruppe gehörige Proteine sind Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), ciliary neurotrophic factor (CNTF), oncostatin M und der leukemia inhibitory factor (LIF). Cardiotrophin-1 wurde 1995 erstmals von Pennica et al. als ein Faktor beschrieben, der an der Entwicklung kardialer Myozyten aus embryonalen Zellen entscheidend beteiligt ist. Anhand von Zellkulturexperimenten an embryonalen Kardiomyozyten der Ratte konnte für das Zytokin CT-1 eine hypertrophe Wirkung aufgezeigt werden. Das Zytokin Cardiotrophin-1 ist hierbei wesentlich potenter als Angiotensin, Endothelin oder die übrigen IL-6-Mitglieder (Pennica et al. 1995a). Die Hypertrophie der Herzmuskelzellen zeigt sich histologisch in einer Neubildung von Sarkomeren, den Untereinheiten der Muskelzellen (Pennica et al. 1995b). Die Sarkomerenbildung findet dabei hauptsächlich in Längsrichtung statt, was zu einer Verlängerung der Muskelzelle führt. Dies führt zu einer exzentrischen Hypertrophie und Kammerdilatation. Vermittelt wird diese Hypertrophie durch einen JAK/STAT (Janus Kinase Signal Transducer and Activation of Transcription) bzw. MEK5-ERK5 (Takahashi et al. 2005) Signalweg: Cardiotrophin-1 bindet dabei an den LIF Rezeptor, woraufhin die Rezeptoruntereinheit gp130 mit dem Ligand-Rezeptorkomplex assoziiert und der Signalweg eingeleitet wird (Pennica et al. 1995a). Der Glykoprotein 130 (gp130)/leukemia inhibitory factor (LIF) Rezeptorkomplex aktiviert dann den JAK/STAT Signalweg (Pennica et al. 1995a, Robledo et al. 1997, Wollert und Chien 1997, Sheng et al. 1997, Pan et al. 1999, Fukuzawa et al. 2000, Yasukawa et al. 2001). Die biologische Aktivität von CT-1 kann dabei durch anti-gp130 Antikörper geblockt werden (Wollert et al. 1996).

Weitere Studien zeigten außerdem einen zytoprotektiven Effekt von Cardiotrophin-1 auf Herzmuskelzellen, wobei ursächlich dafür eine Inhibition der Apoptose gesehen wird (Wollert und Chien 1997, Sheng et al. 1997, Ghosh et al. 2000). Der antiapoptotische Effekt von Cardiotrophin-1 erfolgt zunächst über die Bindung an den gp130/LIF Rezeptorkomplex. Der weitere Signalweg läuft über den Phosphoinositol-3-Kinase/Akt Signalweg (Kuwahara et al. 2000, Lopez et al. 2005) sowie über mitogen aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) (Sheng et al. 1997, Goette et al. 2002, Liao et al. 2002). Bisherige Studien weisen zudem auf eine Beteiligung von STAT3 bei der Hypertrophie und von STAT1 bei der Apoptose hin (siehe Abb. 2.5.1 aus Wollert und Chien 1997).

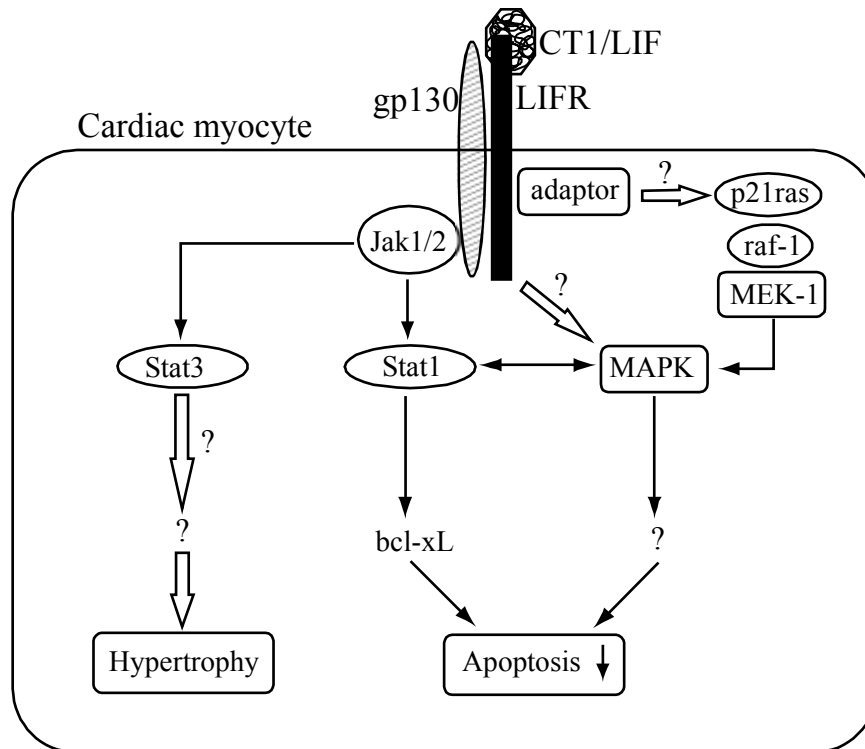


Abb. 2.5.1: Vereinfachtes Schema der intrazellulären Signaltransduktion nach CT-1-Stimulation (aus Wollert und Chien 1997).

Untersuchungen über die Coxsackievirus B3 induzierte Myokarditis der Maus zeigen, dass CT-1 über eine Myozytenproliferation und die Modulation anderer Zytokine in der Lage ist, einen protektiven Effekt auf geschädigte Kardiomyozyten auszuüben (Okuno et al. 2000).

Das Zytokin CT-1 wirkt dabei nicht nur auf Myozyten, sondern beispielsweise auch auf Zellen des vaskulären Systems. So konnte für CT-1 in tierexperimentellen Untersuchungen eine blutdrucksenkende Wirkung aufgezeigt werden (Jin et al. 1998).

2.6 Bedeutung der Apoptose in der Herzinsuffizienz

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und bedeutet übersetzt “Abfallen der Blätter“. Die Apoptose wurde im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod 1972 in einer Veröffentlichung von Kerr, Wyllie und Currie geprägt. Es handelt sich dabei um ein genetisch determiniertes Programm, welches Zellen nach bestimmten endogenen und exogenen Signalen dazu bringt, sich selbst zu eliminieren (Kerr et al. 1972).

Der Verlust an Kardiomyozyten wird von einigen Autoren als einer der bedeutensten pathogenetischen Charakteristika der Herzinsuffizienz angesehen (Beltrami et al. 1994, Haunstetter und Izumo 1998, Knaapen et al. 2001). Die erste Untersuchung zur Apoptose im Herz wurde 1994 von James veröffentlicht (James 1994). Mehrere nachfolgende Studien befassten sich

mit der engen Beziehung zwischen der Apoptose im Myokard und dem Auftreten von Herzerkrankungen (Narula et al. 1996, Olivetti et al. 1997, Saraste et al. 1997, Anversa 1998, Pankuweit et al. 1999, Hong et al. 2000, Kumar et al. 2002, Jones 2003).

In der Entwicklung der Herzinsuffizienz ist die dehnungs- bzw. überlastungsinduzierte Apoptose, die neuroendokrin und parakrin vermittelte Apoptose und die Apoptose durch Angiotensin II, Sympathikomimetika, Endothelin und Zytokine beschrieben (Maisch 1999, Kang und Izumo 2000). Zytokine können dabei sowohl eine Funktion als Apoptose-Induktoren, wie auch -Inhibitoren einnehmen.

Der Stellenwert der Apoptose bei der Entstehung der Herzinsuffizienz ist allerdings zum Teil noch unklar. Feuerstein nennt in diesem Zusammenhang drei Gründe, die für eine Progredienz der Herzerkrankung, bedingt durch Apoptose, sprechen (Feuerstein 2001):

- erstens der Verlust an Myozyten, wodurch der Herzmuskel in seiner Integrität gestört werde.
- zweitens die verminderte elektrische Leitfähigkeit innerhalb des Gewebes,
- und drittens der postapoptotischen Umbau des Herzmuskels, der zu einer Verschlechterung der mechanischen Funktion führe.

2.7 Nachweis der Apoptose im Myokard

Um den Prozess der Apoptose nachzuweisen, bestehen mehrere Methoden, die jedoch alle bestimmten Einschränkungen unterworfen sind (Anversa 1998, Schaper et al. 1999).

In dieser Untersuchung haben wir die beiden Apoptosemarker TUNEL und Gewebstransglutaminase (Tissue-Transglutaminase) verwandt. Der Apoptosenachweis im Myokard anhand der TUNEL (terminale deoxynucleotidyl-transferase nick-end-labeling / Transferase-Uridine-Nick-End-Labeling) Methode stellt eines der etabliertesten Verfahren dar. Die Methode wurde erstmals von Gavrieli et al. angewandt und kann sowohl an Kryo- und Paraffinschnitten von Geweben, als auch an Zellpräparaten durchgeführt werden (Gavrieli et al. 1992). Die TUNEL-Methode macht sich ein wichtiges biochemisches Merkmal der Apoptose zunutze, nämlich die Aktivierung intrazellulärer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängiger Endonukleasen (Wyllie 1987), welche zu einer Fragmentierung der DNA mit konsekutiver Erhöhung von freien 3'-OH Enden führt.

Der Nachweis von DNA-Fragmentation anhand der TUNEL-Methode ist jedoch nicht spezifisch für die Apoptose (Schulze-Osthoff et al. 1994, Elsässer et al. 2000), da z.B. TUNEL-positive Zellen zwar apoptotisch, aber auch onkotisch bzw. nekrotisch sein können (Ohno et

al. 1998, Saraste 1999) oder sich in diesen Zellen Reparaturmechanismen an der DNA abspielen können (Kanoh et al. 1999). Aus diesem Grund haben wir in unserer Untersuchung einen weiteren Apoptosemarker, die Tissue-Transglutaminase, verwandt.

Die Tissue-Transglutaminase (TTG) oder auch Transglutaminase Typ 2 ist ein Enzym, welches Ca^{2+} abhängige Transferaktionen von Acyl- Donoren (γ Carboxyamidgruppen peptidgebundener Glutaminreste) auf Acyl- Akzeptoren (primäre Aminogruppen) katalysiert (Fesus et al. 1987, Greenberg et al. 1991, Piacentini et al. 1991). Mit Einsetzen des apoptotischen Vorganges in den Zellen wird dieses Enzym sowohl vermehrt exprimiert als auch aktiviert (Fesus et al. 1991, Knight et al. 1993, Nagy et al. 1994, Piacentini 1995, Aschoff et al. 1996, Cummings 1996). Das Enzym beteiligt sich an der kovalenten Verknüpfung von Polypeptidketten und der Bildung der apoptotischen Körperchen (Fesus et al. 1987, Piacentini et al. 1991, Greenberg et al. 1991, Autuori et al. 1998, Aeschlimann und Thomazy 2000). Die strukturelle Integrität der Zelle wird somit garantiert und eine Entzündungsreaktion verhindert (Fesus et al. 1991, Piredda et al. 1999). Unter den normalen Bedingungen ist die TTG in ihrer Ca^{2+} abhängigen Quervernetzungsaktivität gehemmt. Steigt jedoch die zytoplasmatische Ca^{2+} Konzentration durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern an, kommt es zur Aktivierung des Enzyms (Fesus et al. 1991). Getriggert durch die erhöhte Ca^{2+} Konzentration kann die Gewebstransglutaminase so den Beginn der Apoptose einleiten (Oliverio et al. 1999).

Aschoff et al. konnten an konsekutiven Semidünnschnitten von Dünndarmgewebe der Maus zeigen, dass die Gewebstransglutaminase nur in Enterozyten vorkommt, die aufgrund morphologischer Kriterien und einem besonderen Muster der DNA- Fragmentation als apoptotisch einzustufen sind. In ISEL (in situ end labelling), einer abgewandelten Form der TUNEL-Methode, positiven Zellen mit regelrechter Zellmorphologie konnte kein Nachweis der TTG erbracht werden (Aschoff et al. 2000, Lotze et al. 2001).

Da sich die Gewebstransglutaminase auch an Differenzierungs- und Wachstumsvorgängen der Zellen beteiligt, ist sie als alleiniger Marker zum Apoptosenachweis nicht geeignet (Greenberg et al. 1991, Melino und Piacenti 1998, Tucholski et al. 2001, Fesus und Piacentini 2002). Der immunhistochemische Nachweis dieses Enzyms eignet sich jedoch parallel zur TUNEL-Methode gut als zweites Kriterium zur Untersuchung der Apoptose in Gewebeschnitten (Lotze 2001).

2.8 Therapie der Herzinsuffizienz

Die derzeitige medikamentöse Stufentherapie bei systolischer linksventrikulärer Dysfunktion basiert auf einer Kombinationstherapie mit Diuretika, ACE-Hemmern, β -Blockern, gegebenenfalls AT-1 Blockern, Herzglykosiden und Aldosteronantagonisten. Ein dosiertes Bewegungstraining, Alkohol- und Nikotinverzicht sowie diätetische Maßnahmen mit Kochsalz und Flüssigkeitsrestriktion unterstützen den medikamentösen Therapieansatz. Bei Beschwerdepersistenz und optimaler Medikation stellt die kardiale Resynchronisationstherapie ein neueres Behandlungskonzept dar.

Trotz verbesserter Medikation ist die Letalität der Herzinsuffizienz weiterhin hoch und die Lebensqualität der Patienten deutlich reduziert (Levy et al. 2002). Eine kausale Therapie setzt die Aufklärung der Ätiopathogenese der Erkrankung voraus. Aus dem besseren Verständnis der spezifischen Wirkung des Zytokins Cardiotrophin-1 in der Herzinsuffizienz kann sich möglicherweise ein Therapieansatz ergeben, mit dem die Progression der Erkrankung aufgehalten werden könnte.

3 Zielstellung

Zytokine spielen in der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine bedeutende Rolle. Aus experimentellen Untersuchungen an Zellkulturen weiß man, dass das Zytokin CT-1 sowohl eine hypertrophierende als auch antiapoptotische Wirkung besitzt. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigt sich Cardiotrophin-1 im Plasma herzinsuffizienter Patienten deutlich erhöht (Ng et al. 2002). Daraus ergibt sich die Frage, welche Rolle diesem Zytokin in der Herzinsuffizienz zuteil wird.

Ziel dieser Arbeit war es, der Fragestellung nachzugehen, wie die Expression des Zytokins in der Herzinsuffizienz getriggert und die beschriebenen unterschiedlichen Wirkungsmechanismen von CT-1 gesteuert werden können. Bei Betrachtung des Zytokins CT-1 in der Herzinsuffizienz ist es folglich von Interesse, inwieweit eine Regulation von CT-1 auf Rezeptorebene stattfindet. Wir bestimmten daher zusätzlich zu dem CT-1 auch den löslichen gp130 Rezeptor im Serum der Patienten.

Wir wollten untersuchen, ob das Zytokin Cardiotrophin-1 abhängig vom Ausmaß bzw. Schweregrad der Herzinsuffizienz in unterschiedlicher Weise exprimiert und freigesetzt wird. Dazu bestimmten wir den Cardiotrophin-1 Spiegel im Serum in Abhängigkeit von dem Schweregrad der Herzinsuffizienz.

Zudem wollten wir überprüfen ob, und falls ja, welcher Zusammenhang zwischen der Ätiopathogenese der Herzinsuffizienz und dem Cardiotrophin-1 Spiegel im Serum besteht.

Im Rahmen dieser Arbeit wollten wir die beschriebene antiapoptotische Wirkungsweise des Zytokins Cardiotrophin-1 näher beleuchten, indem wir einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Cardiotrophin-1 Spiegel und der Apoptose im Myokard herzinsuffizienter Patienten untersuchten. Dabei gingen wir auch auf die Frage ein, welche Bedeutung der Apoptose in der Herzinsuffizienz zukommt.

Aus der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass sich der Nachweis eines enteroviralen Genoms günstig auf die Apoptose im Myokard auswirkt, indem die virale Entzündungsreaktion eine antiapoptotische Wirkung ausübt. Diesen Ansatz suchten wir anhand unserer Datenlage weiter zu verfolgen.

4 Material und Methoden

4.1 Patienten – klinische Daten und Einteilungskriterien

Von Januar 1999 bis März 2003 wurden 138 herzinsuffiziente Patienten in diese Arbeit eingeschlossen. Alle Patienten haben sich einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen, anhand derer eine koronare Herzerkrankung (KHK) als Ursache der Herzinsuffizienz ausgeschlossen werden konnte. Zur weiteren Abklärung der Genese der Herzinsuffizienz wurde im Rahmen des Herzkatheters bei jedem Patienten eine Myokardbiopsie entnommen. Unter Hinzuziehung der histologischen Ergebnisse wurden als Diagnosekriterien einer inflammatorischen Kardiomyopathie die WHO Task Force Kriterien von 1995 zugrundegelegt. Zudem wurden die Endomyokardbiopsien der Patienten auf ein möglicherweise persistierendes Virusgenom (Enteroviren, Parvoviren und Adenoviren) untersucht.

Alle Patienten wurden mittels Echokardiographie hinsichtlich der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF, Simpson-Methode) und des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD), sowohl zum Zeitpunkt der Herzkatheteruntersuchung als auch bei späteren Kontrolluntersuchungen, charakterisiert. Die Daten dieser späteren Untersuchungen, bei denen der Verlauf der EF und des LVEDD dokumentiert wurden, liegen in einem Zeitraum zwischen 3 und 44 Monaten (im Mittel 16,75 Monate).

Die Patienten erhielten abhängig von ihrem Erkrankungsschweregrad eine Herzinsuffizienztherapie, die aus Diuretika, ACE-Hemmern oder AT-1 Antagonisten, β -Blockern und Aldosteronantagonisten bestand.

Zur klinischen Einschätzung der Schwere der Herzinsuffizienz wurde das BNP im Blutplasma zum Zeitpunkt der Biopsie gemessen und eine Einteilung der Patienten anhand der NYHA-Klassifikation vorgenommen.

4.2 BNP Bestimmung

In dieser Untersuchung erfolgte die Bestimmung des brain natriuretic peptide im Serum der Patienten. Verwendet wurde dabei der Triage BNP-Test (Biosite Diagnostics, San Diego, California). Bei dem Test handelt es sich um einen Immunoassay mit Fluoreszenzdetektion zur Bestimmung des BNP (Messbereich 5 - 1500 pg/ml). Die Probengewinnung erfolgte durch periphere Venenpunktion und Sammlung in Serum-Röhrchen. Das Ergebnis kann aus dem Teststreifen mit Hilfe des Triage Testgerätes nach ca. 20 min. direkt abgelesen werden. Zur

Abgleichung der Messwerte erfolgte in regelmäßigen Abständen die Tarierung der Standardkurve anhand von Kontrollproben.

4.3 Cardiotrophinmessung im Serum

Von jedem Patienten wurden Serumproben in das toxikologische Forschungsinstitut der Medizinischen Universität Leicester (Professor L. L. Ng, Leicester, UK) eingeschickt und die Cardiotrophinwerte im Blutserum mittels nichtkompetitiver Immunochemilumineszenz gemessen. Die Messung erfolgte unter Verwendung zweier affinitätsgereinigter Antikörper, von denen der eine spezifisch am C-terminalen Ende (Aminosäuren 186-199) und der andere in der mittleren Region (Aminosäuren 105-120) des Proteins bindet (Ng et al. 2002).

4.4 TNF α und sgp130 Bestimmung

Bei dem sgp130 handelt es sich um den löslichen gp130 Rezeptor, quasi ein "Abscheideprodukt", der im Serum der Patienten gemessen wird und sich äquivalent bezüglich der Expression des gp130 Rezeptors verhält. Die Serumkonzentrationen des löslichen Glykoproteins 130 (sgp130) und des Tumornekrosefaktors α (TNF α) wurden mit einem Enzym-gekoppelten Immunoassay / ELISA-Test (HS human TNF α bzw. human sgp130, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany) bestimmt. Angewandt wurde dabei die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Vorhandene TNF α Proteine wurden von immobilisierten Antikörpern gebunden, worauf die weitere Zugabe eines für den TNF α spezifischen enzymgebundenen polyklonalen Antikörpers erfolgte. Zuletzt führt die Zugabe einer Substratlösung zu einer Farbentwicklung, welche sich proportional zur TNF α Konzentration verhält. Nach demselben Prinzip wurden die im Blut messbaren Konzentrationen an löslichem gp130 ermittelt.

4.5 Gewebegewinnung und Aufarbeitung

4.5.1 Entnahme der Biopsie

Allen Patienten wurden im Durchschnitt sechs Gewebeproben aus der Seitenwand des linken Ventrikels mit Hilfe eines Katheters, der über die Arteria femoralis eingeführt wurde, entnommen. Für die Entnahme des Myokardgewebes wurde dabei ein Cordis long sheath biopptome (Cordis Corporation, Miami, FL, USA) verwendet. Nach dem Eingriff wurden die Biopsien umgehend in fünfprozentigem Paraformaldehyd in 0,1 molarer Phosphat-gepufferter Nat-

riumlösung (PBS) fixiert. Für die virologischen Untersuchungen wurden die Myokardbiopsien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C kryokonserviert.

4.5.2 Histologische Beurteilung und Enterovirusnachweis

Die histologische Begutachtung der Bioptate erfolgte in der Abteilung für Pathologie (Leiter Prof. G. Mall) am Klinikum Darmstadt. Zudem wurden CD2, CD4, CD8, Monozyten und Makrophagen mit Antikörpern gegen die genannten Antigene immunhistochemisch nachgewiesen und die Anzahl pro mm² angegeben.

Die Bestimmung enteroviraler RNA erfolgte durch das Virologische Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena mittels PCR und anschließender Southern-Blot-Hybridisierung: Die RNA-Extraktion wurde an -80°C kryokonserviertem Herzmuskelgewebe nach der Guanidinium-thiocyanat-phenol-chloroform Methode (Chomczynski und Sacchi 1987) vorgenommen. Die so gewonnene Enterovirus-RNA wurde durch Oligo-dt Priming in cDNA umgeschrieben. Durch eine anschließend folgende PCR (Titan One Tube™ System, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) wurde der Nachweis enteroviraler RNA erbracht. Die dabei verwendeten Primer erkennen einen Abschnitt im 5' Bereich der Enteroviren-Genome.

Zur Erhöhung der Sensitivität und Bestätigung der Spezifität wurde eine Hybridisierung des PCR-Produktes anhand der Southern-Blot-Technik durchgeführt. Hierzu wurde eine spezifische Digoxigenin-markierte DNA-Sonde eingesetzt, die mit Hilfe von internen enterovirus-spezifischen Primern und DIG-11-dUTP (Roche Diagnostics) hergestellt wird. Nach Hinzugabe eines Antikörpers (Anti-DIG-Apoptose, Roche Diagnostics) erfolgte die Detektion durch Chemilumineszenz (CSPD™, Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.6 Apoptosenachweis im Herzmuskelgewebe

4.6.1 Histochemische Gewebeaufbereitung

Die Aufbereitung und Färbung der Biopsien erfolgte im Institut für Anatomie. Hierzu wurden die in Paraformaldehyd fixierten Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und in Epon-Harz eingebettet. Anschließend lässt man das eingebettete Gewebe ca. 2 Wochen aushärten. Zur Weiterverarbeitung wurden die Gewebestücke mit einem Diamantmesser der Firma Diatome auf einem Ultracut Mikrotom (Fa. Reichert & Jung) auf 1µm geschnitten. Von jedem Patienten wurden mehrere Folgeschnitte angefertigt und anschließend auf Objektträger aufgebracht.

Für die weitere Verarbeitung ist ein Entharzen der Schnitte notwendig. Dazu werden die Schnitte nacheinander mit methanolischem NaOH, Methanol-Benzol (1:1) und Aceton (2x) über jeweils 3 Minuten behandelt und anschließend für 10 Minuten in PBS gewaschen.

4.6.2 TUNEL-Färbung

Der Nachweis von apoptotischen Zellen im TUNEL-Test erfolgt, indem man mittels einer Transferase an die durch die DNA-Fragmentation freigelegten 3'-Enden ein mit Fluoreszein markiertes dUDP transferiert. Mit Peroxidase verknüpfte Fluoreszein-, bzw. BrdU-Antikörper binden nun in einem zweiten Schritt an die entsprechend markierten DNA-Enden. Nach Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) kommt es zur selektiven Anfärbung im Bereich der fragmentierten DNA.

Bei der hier zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen angewandten Methode handelt es sich um eine von Aschoff an murinen Jejunumschnitten beschriebene hochsensitive BrdU In-Situ nick-End-Labeling-Methode (ISEL), welche auf demselben Prinzip wie die herkömmliche TUNEL-Methode beruht, allerdings mit dem Unterschied, dass hierbei BrdU (Bromodesoxyuridin) statt z.B. dUDP verwendet wird (Aschoff et al. 1996).

Zur TUNEL-Färbung wurde von jedem Patienten ein Objektträger (mit je zwei Folgeschnitten) gewählt und dieser nach dem Entharzen (s.o.) eine Stunde bei 37°C in einem Apoptosemix inkubiert.

Der Apoptosemix setzt sich aus folgenden Ingredients zusammen:

8µl TdT (Terminale deoxynucleotidyl-Transferase)-Puffer (Boehringer Mannheim), 3µl CoCl₂ (Boehringer Mannheim), 2µl BrdU (Aschoff), 4µl TdT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) auf 400µl PBS. Nun, wie auch nach jeder weiteren Inkubation, erfolgt ein zweimaliges Waschen in PBS. Danach werden die Schnitte in 20 %igem Normalserum der Ziege für 30 min. bei 20°C präinkubiert. Anschließend wird mit einem primären Maus anti-BrdU monoklonalem Antikörper (Progen, Heidelberg, Germany, 1:100 verdünnt) für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Bei einer sich anschließenden Inkubation mit einem sekundären Ziege-anti-Maus monoklonalem Antikörper (Sigma St. Louis USA, 1:100 verdünnt) für 30 min. bei 20°C kann BrdU nachgewiesen und das Signal verstärkt werden. Darauf folgend wird mit einem Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (Maus-monoklonalem-PAP, Sigma 1:100) verdünnt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, und in einem weiteren Schritt die DNA fragmentierten Zellen mit Diaminobenzidin (DAB, Peroxidase Substrate Tablet Set, Sigma) sichtbar gemacht. Die Einwirkzeit von DAB beträgt 15 min., wobei die entstehende Braunfärbung durch eine Peroxidasereaktion hervorgerufen wird.

Abschließend werden die Schnitte 10 min. in destilliertem Wasser gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %iger, 70 %iger, 90 %iger, zweimal absoluter Alkohol, zweimal Xylol) entwässert und in Entellan eingedeckt.

Die Kontrollen werden nach dem gleichen Protokoll mit einem TdT freien Gemisch behandelt.

4.6.3 Transglutaminase-Färbung

Die Transglutaminase-Färbung wurde an unmittelbaren Folgeschnitten der TUNEL-Färbung vorgenommen. Gefärbt wurde jeweils ein Objektträger mit je zwei Folgeschnitten. Hierzu wurden die Schnitte nach dem Entharzen 10 min. in PBS Puffer der Zusammensetzung 46,6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mit 9,0g KH_2PO_4 und 45,0g NaCl auf 5 Liter destilliertem Aqua gewaschen und darauf folgend 24 Stunden mit einem TTG-Antikörper (anti type 2 transglutaminase, anti Ziege polyklonalem Antikörper, Upstate Lake Placid, NY, USA) inkubiert. (Verdünnung 1:1000 in PBS zusammen mit 1 %igem Normalserum vom Kaninchen). Sich abwechselnd mit je zweimal 10 minütigen Waschvorgängen in PBS erfolgte dann nacheinander die Inkubation mit einem zweiten biotinylierten Antikörper (anti-Ziege im Kaninchen IgG, Vector Laboratories) und mit Avidin-Pferd Rettich-Peroxidase (Avidin-Peroxidase, Sigma, Taufkirchen, Germany), jeweils 1:100 verdünnt für eine Stunde bei 20°C. Anschließend wurden die Schnitte mit DAB (Sigma) behandelt, wobei der Transglutaminasenachweis anhand einer Braunfärbung erbracht wird. Zuletzt wurden die Schnitte wiederum 10 min. in destilliertem Wasser gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe (s.o.) entwässert und in Entellan eingedeckt. Für die Negativkontrollen wurde statt des TTG-Antikörpers verdünntes Normalserum verwendet.

4.6.4 Auswertung der Gewebeschnitte

Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte lichtmikroskopisch an einem BX 50 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Germany) unter 400-facher Vergrößerung. Die TUNEL gefärbten Ausschnitte (Frames) wurden zuerst mit der Interferenz-Kontrast-Mikroskopie sowie anschließend fluoreszenzmikroskopisch beurteilt. Ein Frame umfasst dabei eine Fläche von ca. $0,0384 \text{ mm}^2$ ($160 \mu\text{m} \times 240 \mu\text{m}$). Um die gesamte Fläche eines Gewebeschnittes zu erfassen wurden drei bis zehn Frames pro Patient aufgenommen. Die Aufnahmen entstanden mit einer Digitalkamera (Olympus DP 10) und wurden später mit Hilfe der Software Adobe Photoshop bearbeitet.

Die morphologische Beurteilung der Transglutaminase-Färbungen erfolgte an unmittelbaren Folgeschnitten.

4.6.5 Auswertung der TUNEL-Färbung und Autofluoreszenzbetrachtung

Mit der TUNEL-Methode lässt sich anhand einer Braunfärbung die Fragmentierung der DNA im Zellkern nachweisen. Daneben werden jedoch auch apoptotische Endothelzellen und eingewanderte Entzündungszellen unspezifisch mitgefärbt.

Skelett- und Herzmuskelzellen zeigen unter UV-Licht der Wellenlänge 440 nm eine Autofluoreszenz. Durch Vorschaltung eines besonderen Filters (WU, Olympus) lassen sich die einzelnen Herzmuskelzellen so gut voneinander abgrenzen. Da sich mit der TUNEL-Methode nur einzelne (DNA fragmentierte) Zellkerne anfärben, war die Ermittlung der Gesamtzellzahl am einfachsten unter Betrachtung der Autofluoreszenz möglich. Intakte Herzmuskelzellen weisen dabei eine intensive gelbgrüne Autofluoreszenz auf. Vergleicht man einzelne Zellen, so lassen sich deutliche Unterschiede in der Stärke der Fluoreszenz verzeichnen. Autofluoreszenzverminderungen treten vorwiegend gemeinsam mit Anzeichen von DNA Fragmentierung im Zellkern auf. Ein Fluoreszenzverlust war besonders im perinukleären Bereich der TUNEL-positiv markierten Myozyten zu verzeichnen.

Die Übergänge der Fluoreszenzausprägung sind schleichend. Es empfiehlt sich jedoch eine Einteilung in drei Gruppen hinsichtlich der Eigenfluoreszenz der Myozyten (siehe Abbildung 5.6.1):

1. Myozyten mit intakter Eigenfluoreszenz
 - Typische Querstreifung der kontraktilen Filamente, Zellgrenzen und Zytosol intakt
2. Myozyten mit eingeschränkter Fluoreszenzfähigkeit
 - Typische Querstreifung der kontraktilen Filamente, Zellgrenzen und Zytosol intakt, jedoch auffällige Fluoreszenzeinbußen
3. Myozyten mit nahezu aufgehobener Eigenfluoreszenz
 - Querstreifenmuster nur noch undeutlich zu erkennen, Zellgrenzen teilweise nicht mehr intakt, ausgeprägte Fluoreszenzverluste

Bei Zellen mit deutlicher Fluoreszenz und intakter Zellbegrenzung wiesen die Zellkerne keine Fragmentierung (Färbung) in der TUNEL-Methode auf. Myozyten mit eingeschränkter bis fehlender Fluoreszenz ließen dagegen vermehrt eine DNA Fragmentierung im Zellkern erkennen.

Die Eigenfluoreszenz stellt ein wichtiges Kriterium in der Abgrenzung zwischen nekrotischen und apoptotischen Myozyten dar, da es im Verlauf der Nekrose zu einer autolytischen DNA Zerstörung kommen kann, woraus in der TUNEL-Färbung ein "falsch positives" Ergebnis resultiert (Gold et al. 1994, Ohno et al. 1998). Die Kombination aus positiver TUNEL-

Färbung im Zellkern und eingeschränkter aber noch vorhandener Eigenfluoreszenz wurde als Zeichen eines apoptotischen Vorganges bewertet (siehe hierzu Tabelle 4.6.5).

Tab. 4.6.5: Einteilungskriterien der Apoptose nach TUNEL und Fluoreszenzbetrachtung der Kardiomyozyten

Intakter Myozyt	Nekrotischer Myozyt	Apoptotischer Myozyt
Gute Eigenfluoreszenz	Stark reduzierte Eigenfluoreszenz	Vorhandene Eigenfluoreszenz
Erhaltene Myofibrillen	Myofibrillenverlust	Myofibrillen erhalten
Unversehrtheit der Zellmembran	Defekte Zellmembran	Zellmembran intakt
Keine Fragmentierung der DNA	DNA Fragmentation im Zellkern	DNA Fragmentation im Zellkern

Die TUNEL-positiv gefärbten Zellkerne derjenigen Myozyten, die gleichzeitig auch eine nachweisbare Eigenfluoreszenz sowie eine unversehrte Zellmembran aufwiesen, wurden in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt. Dabei fiel eine unterschiedliche Morphologie der Zellkerne auf, was einerseits die Intensität der Kernfärbung als auch die Form des Kerns betraf. Kerne mit intensiver, starker Braunfärbung zeigten lichtmikroskopisch eine auffällig “zerklüftete“ Oberfläche bei einer ansonsten guten Zellkernbegrenzung, wohingegen bei den weniger stark gefärbten Kernen eine asymmetrische, starke Lappung des Zellkerns auffiel. Aufgrund dieser Kriterien erfolgte bei der Auswertung eine Einteilung in stark (++) und schwach (+) positiv gefärbte Kerne, wobei das wesentliche Entscheidungskriterium für eine stark positive TUNEL-Färbung eine intensive Braunfärbung mit teilweise dunkelbrauner Körnung war.

Wenn bei Myozyten mit ausgeprägten Fluoreszenzverlusten eine Beschädigung der Zellbegrenzung (Risse, Substanzdefekte, etc.) zu erkennen war, wurden diese nicht in die Auswertung mit einbezogen und als Artefakt gewertet. Ursächlich für solche Artefakte sind u. a. mechanische Schäden an den Zellen bei der Entnahme der Biopsie sowie prozedurale Schäden beim Schneiden des Gewebes. Derart beschädigte Zellen zeigten regelmäßig eine TUNEL-positive Kernfärbung.

4.6.6 Auswertung der Transglutaminase-Färbung

Die Auswertung der Transglutaminaseexpression der Kardiomyozyten erfolgte standardisiert mit den Programmen Photoshop (Adobe) und ImageJ 1.29x (Wayne Rasband, USA). Durchschnittlich wurden fünf Frames pro Biopsie betrachtet.

Bei dem Programm ImageJ handelt es sich um ein Java Bildbearbeitungsprogramm, welches in unserem Fall zur quantitativen Flächenbestimmung der TTG-Expression herangezogen wurde. Die Immunpräzipitate fanden sich vorwiegend im Zytosol der Herzmuskelzellen, wobei aber vorhandene Bindegewebs-, Endothel- und Entzündungszellen ebenso positive Transglutaminaseexpressionen aufwiesen. Auch am Rand der Myokardzellen zeichnete sich das Diaminobenzidin als bräunliche Ablagerung (Färbung) ab. Da in unserer Studie nur die Transglutaminaseexpression der Kardiomyozyten in die Auswertung eingehen sollte, musste jedes Bild zuvor so im Photoshop bearbeitet werden, dass eine quantitative Auswertung mit dem ImageJ Programm möglich wurde:

Zuerst wurden die Nicht-Myozyten und die unspezifischen Ablagerungen des Detektionsfarbstoffes am Rand der Kardiomyozyten aus dem Bild eliminiert (siehe hierzu Abbildung 5.6.2b). Freie Flächen und Artefakte wurden „ausgeschnitten“, so dass letztendlich nur noch Myozyten im Längs- bzw. Querschnitt das Bild bestimmten.

Anschließend wurde mit dem ImageJ Programm unter Angabe der Pixelanzahl die gesamte Herzmuskelfläche ermittelt. In einem weiteren Schritt (s.u.) wurde nur der TTG gefärbte Bereich erfasst und anhand dieser beiden Werte der prozentuale Anteil an TTG angegeben.

$$\text{TTG Nachweis [\%]}: \frac{\text{TTG gefärbte Gewebeschnittfläche}}{\text{Gesamte Gewebeschnittfläche}} \times 100$$

Um die TTG gefärbten Bereiche der Myozyten flächenmäßig erfassen zu können, wurde das Bild erneut im Photoshop bearbeitet. Dort wurde der jeweilige Brauntone des Detektionsfarbstoffs Diaminobenzidin festgelegt. Die Toleranzgrenze dieses Brauntones wurde so gewählt, dass ein eindeutiger Unterschied zwischen TTG-Expression und den übrigen nichtmarkierten Bezirken im Zytosol erfolgen konnte.

4.7 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software STAT-View 4.1 für MacOS. Die Angaben der Ergebnisse der klinischen Untersuchungen erfolgten als Mittelwerte. In den Diagrammen wurde jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Korrelation zwischen einzelnen Variablen wurde mit dem Spearman-Rang-Korrelationstest berechnet. Vergleiche kontinuierlicher Daten der beiden Herzinsuffizienzgruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test, Vergleiche nominaler Daten mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ bzw. auf $p < 0,01$ für ein hohes Signifikanzniveau festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Patienten

Von den 138 in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten waren 117 Patienten Männer, und 21 Patienten (15,2 %) waren Frauen. Der BMI (Body Mass Index) betrug für die Männer durchschnittlich $26,9 \text{ kg/m}^2$. Bei den Frauen lag der durchschnittliche BMI bei $27,0 \text{ kg/m}^2$. Zum Zeitpunkt der Biopsie betrug das Alter der Patienten zwischen 17 und 73 Jahre ($47,9 \pm 13,2$ Jahre). Echokardiographisch konnte ein linksventrikulärer enddiastolischer Diameter (LVEDD) von $63,4 \pm 9,9 \text{ mm}$ und eine Ejektionsfraktion (EF) von $39,6 \pm 16,1 \%$ verzeichnet werden.

Anhand der histologischen Ergebnisse der Myokardbiopsien konnten den 138 Patienten folgende Diagnosen zugeordnet werden:

Tab. 5.1: Diagnosen der Patienten

Diagnosen	Anzahl Patienten [n]
Dilatative Kardiomyopathie (DCM)	86
Inflammatorische Kardiomyopathie	27
Lupus erythematodes	2
Riesenzellmyokarditis	1
Amyloidose	5
Nicht gesicherte Diagnose	17

Im Beobachtungszeitraum bis zum März 2003 verstarben 14 der 138 Patienten (10,1 %).

5.2 BNP als Herzinsuffizienzmarker

Bei 95 der 138 Patienten erfolgte eine dokumentierte Einteilung nach dem Schweregrad der Herzinsuffizienz anhand der NYHA-Klassifikation. Hierbei konnte bei 15 Patienten ein NYHA I-, und bei 37 Patienten ein NYHA II Stadium verzeichnet werden. Weitere 36 Patienten wiesen das Stadium NYHA III auf, und 7 Patienten befanden sich im NYHA IV Stadium.

Zusätzlich zu der Einteilung nach der NYHA-Klassifikation erfolgte in demselben Zeitraum, in dem auch die Herzmuskelbiopsie durchgeführt wurde, die Messung von BNP (brain natriuretic peptid) im Serum der Patienten.

Den Zusammenhang zwischen BNP und der Einteilung nach der NYHA-Klassifikation in unserem Patientenkollektiv veranschaulicht Abbildung 5.2:

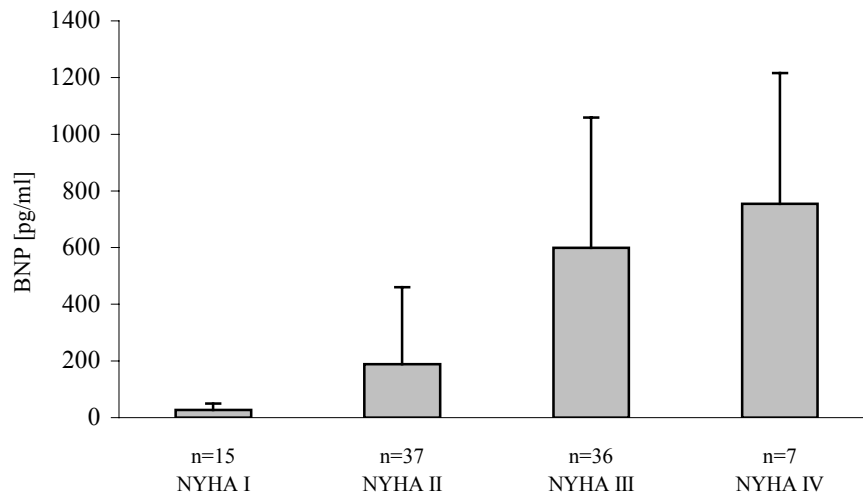


Abb. 5.2 Zusammenhang zwischen BNP und dem NYHA-Stadium

Die Abbildung zeigt, dass mit zunehmender Schwere der Herzinsuffizienz bzw. subjektiver Luftnot des Patienten, gemessen anhand der Einteilung nach NYHA, das BNP im Serum der Patienten deutlich ansteigt.

5.2.1 Generierung zweier Herzinsuffizienzgruppen anhand des BNP-Wertes

Anhand des BNP-Wertes, welcher eine Objektivierung in der Schwere der Herzinsuffizienz zulässt, wurden zwei Herzinsuffizienzgruppen voneinander unterschieden:

Gruppe I: BNP-Wert < 50 pg/ml

Gruppe II: BNP-Wert > 1000 pg/ml

Nach dieser Einteilung umfasst die Gruppe I ein Patientenkollektiv von 42 Patienten mit einer eher leichten Herzinsuffizienz. 15 Patienten dieser Gruppe befinden sich im NYHA I Stadium, 21 Patienten gehören dem NYHA II Stadium an, und 6 Patienten der Gruppe I befinden sich im Stadium III.

In der Gruppe II befinden sich 14 Patienten der NYHA Stadien III und IV, sowie ein Patient im Stadium NYHA II.

Die klinischen Daten der Patienten dieser beiden Herzinsuffizienzgruppen zeigt Tabelle 5.2.1:

Tab. 5.2.1: Klinische Daten der Patienten in den Herzinsuffizienzgruppen I und II

	Gruppe I (BNP < 50 pg/ml)	Gruppe II (BNP > 1000 pg/ml)	p
Anzahl Patienten	42	15	
Alter in Jahren	40,8 ± 14,4	53,6 ± 10,7	< 0,01
Männliches Geschlecht	39	13	n.s.
Weibliches Geschlecht	3	2	n.s.
BMI [kg/m ²]	27,3	23,5	< 0,01
NYHA Klasse I	15	0	< 0,05
NYHA Klasse II	21	1	< 0,05
NYHA Klasse III	6	10	n.s.
NYHA Klasse IV	0	4	< 0,05
BNP [pg/ml]	22,4 ± 15,6	1326,0 ± 353,2	< 0,0001
Echo EF [%]	41 ± 13	28 ± 13	< 0,01
LVEDD [mm]	61,6 ± 7,1	61,7 ± 13,1	n.s.
Lävokardiographie EF [%]	47,8 ± 14,3	29,5 ± 13,8	<0,0001
Kontrolle Echo EF [%]	51 ± 12	43 ± 17	n.s.
Kontrolle LVEDD [mm]	57,4 ± 7,6	60,8 ± 10,3	n.s.

Tabelle 5.2.1 zeigt, dass Patienten der Gruppe II mit hohen BNP Werten durchschnittlich ein höheres Alter und einen geringeren BMI besitzen. In der Gruppe der leicht herzinsuffizienten Patienten (Gruppe I) zeigt sich mit durchschnittlich 41 % eine signifikant bessere Ejektionsfraktion als in der Gruppe der schwer herzinsuffizienten Patienten, in der die durchschnittliche EF nur 28 % beträgt. Bei Betrachtung der Kontrollergebnisse der Ejektionsfraktion fällt in beiden Herzinsuffizienzgruppen eine deutliche Verbesserung der Werte auf. Der durchschnittlich 16,75 Monate später ermittelte Kontrollwert für die EF beträgt in der Gruppe I 51 %, und in der Gruppe II 43 %. Bei den Kontrolluntersuchungen des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD) konnte in beiden Gruppen eine geringfügige Verkleinerung des Ventrikels verzeichnet werden.

In der Herzinsuffizienzgruppe I mit BNP Werten < 50 pg/ml waren im März 2003 bis auf einen Patienten noch alle 41 Patienten am Leben. Dies entspricht einer Sterblichkeitsrate von 2,4 %.

The graph displays the number of patients over time for two groups. The y-axis represents the number of patients (Anzahl Patienten) from 0 to 45. The x-axis shows dates from Jan 99 to Jan 03. Gruppe I (marked with 'x') is a constant horizontal line at 42 patients. Gruppe II (marked with 'o') starts at 15 patients and shows a gradual decline, reaching 9 patients by January 2003.

Datum	Gruppe I (x)	Gruppe II (o)
Jan 99	42	15
Mai 99	42	15
Sep 99	42	15
Jan 00	42	15
Mai 00	42	14
Sep 00	42	13
Jan 01	42	13
Mai 01	42	12
Sep 01	42	11
Jan 02	42	11
Mai 02	42	10
Sep 02	42	9
Jan 03	42	9

5.3 TNF α in der Herzinsuffizienz

Es ergaben sich in der Gruppe II signifikant ($p < 0,01$) erhöhte TNF α Spiegel (durchschnittlich $14,82 \pm 9,6$ pg/ml in der Gruppe II im Vergleich zu $8,38 \pm 8,6$ pg/ml in der Gruppe I; siehe Abbildung 5.3).

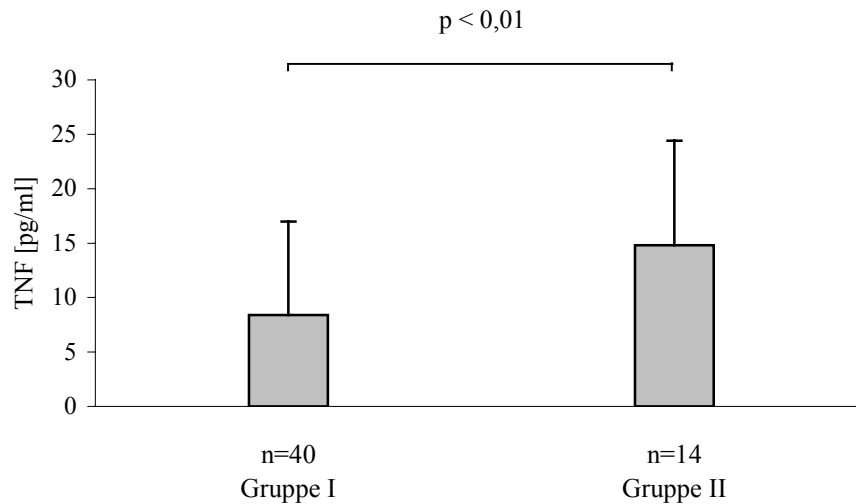


Abb. 5.3: TNF α Spiegel in den Herzinsuffizienzgruppen I und II

5.4 Cardiotrophin-1 in der Herzinsuffizienz

Die Bestimmung des Cardiotrophin-1 Spiegels erfolgte bei 40 Patienten der Gruppe I, sowie bei 12 Patienten der Gruppe II. Es ergaben sich signifikant ($p < 0,01$) erhöhte Serumspiegel für CT-1 in der Gruppe II ($53,7 \pm 121,5$ fmol/ml in der Gruppe II im Vergleich zu $15,5 \pm 34,9$ fmol/ml in der Gruppe I; siehe Abbildung 5.4).

Eine direkte Korrelation der CT-1 Spiegel im Serum mit den jeweiligen Ergebnissen der BNP-Messung zeigte jedoch keinen signifikanten Zusammenhang (Daten nicht gezeigt).

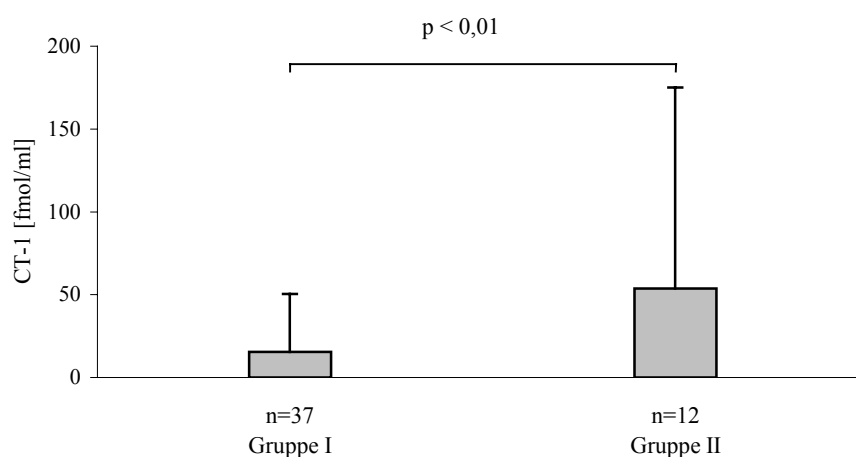


Abb. 5.4: Cardiotrophin-1 Spiegel in den Herzinsuffizienzgruppen I und II

5.5 Der Rezeptor Glykoprotein 130 in der Herzinsuffizienz

Bei Betrachtung des löslichen Glykoproteinrezeptors 130 (sgp130) im Serum der Patienten zeigten sich in der Gruppe II (im Vergleich zur Gruppe I) signifikant ($p < 0,001$) erhöhte sgp130 Spiegel im Serum der Patienten ($363,6 \pm 81,9$ ng/ml in der Gruppe II versus $258,9 \pm 82,6$ ng/ml in Gruppe I; siehe Abbildung 5.5).

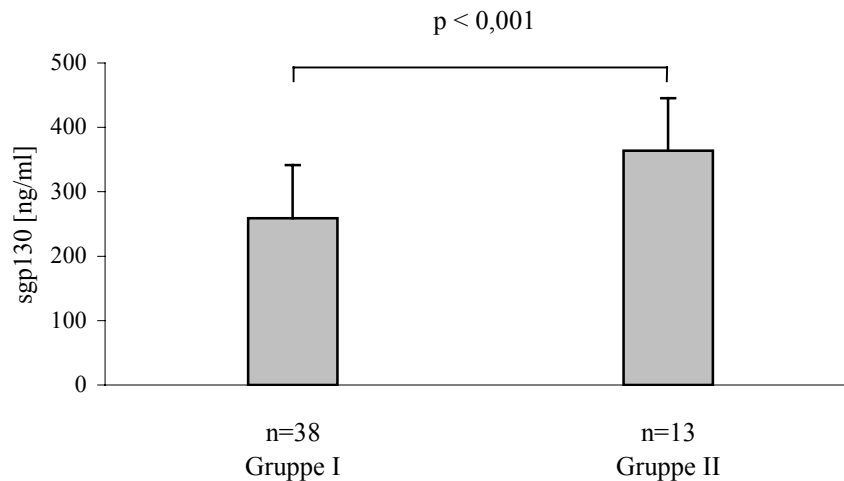


Abb. 5.5: sgp130 Serumspiegel in den Herzinsuffizienzgruppen I und II

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Zytokin CT-1 und dem Rezeptor gp130 zeigte sich in unserer Untersuchung nicht.

5.6 Histochemische Apoptosefärbungen

Von den 138 Patienten, die sich primär in der Studie befanden, konnten in 23 Fällen keine histochemischen Färbungen angefertigt werden, da zuwenig bzw. gar kein Gewebematerial vorlag (leere bzw. zu kleine Biopsie oder nahezu ausschließlich Bindegewebe). Bei weiteren 23 Patienten war die Qualität der Gewebeproben in mindestens einer der Färbungen so schlecht, dass keine sichere Auswertung möglich war.

5.6.1 Ergebnisse der TUNEL-Methode

Insgesamt konnte bei 92 Patienten dieser Studie anhand der TUNEL-Methode eine Aussage zur Apoptoserate des Herzmuskelgewebes getroffen werden.

Der prozentuale Anteil an Zellkernen, die mit der TUNEL-Methode einen positiven Nachweis bezüglich einer DNA-Fragmentierung zeigten, liegt abhängig von Patient und Auswertungskriterien des betrachteten Ausschnittes in unserer Studie zwischen 0 und 76 %. Im Mittel liegt dieser Wert für die TUNEL-positiven Zellen gesamt (Anzahl der stark ++ und schwach + positiv gefärbten Kerne) bei $11,2 \pm 21,3$ %. Betrachtet man hingegen nur die stark positiv angefärbten Kerne, so schwankt die Rate zwischen 0 und 11,6 %, mit einem durchschnittlichen Prozentsatz an Apoptose von $1,7 \pm 2,5$ %.

Bei den Kontrollfärbungen, die an Folgeschnitten nach der gleichen Prozedur, nur ohne den primären Antikörper durchgeführt wurden, ließ sich keine Kernfärbung nachweisen.

Die exemplarische Auswertung eines Ausschnittes unter TUNEL-Fluoreszenzbetrachtung ist in der Abbildung 5.6.1 dargestellt.

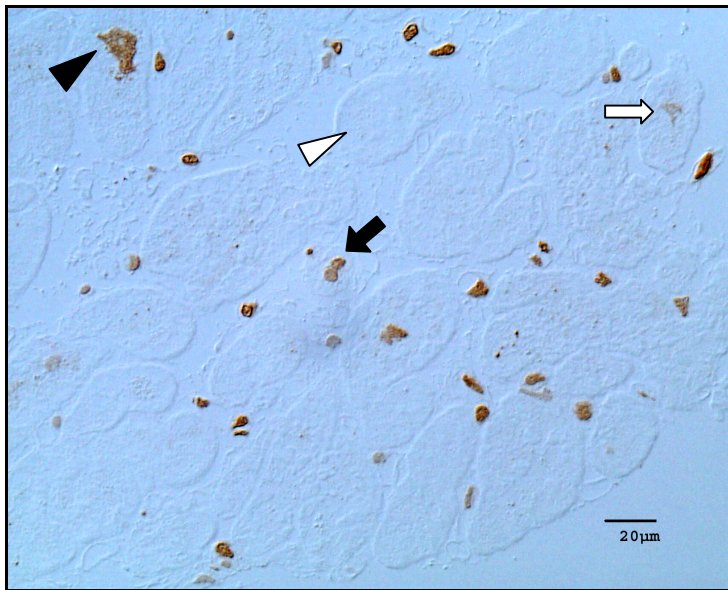


Abb. 5.6.1a

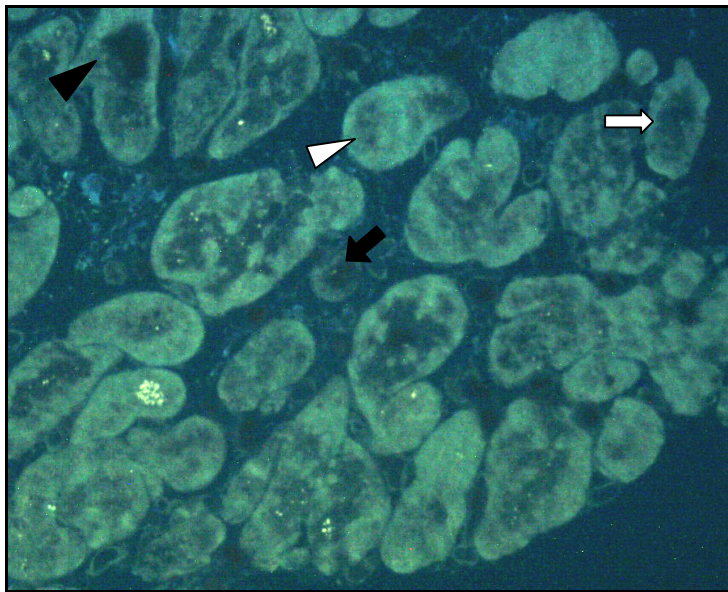


Abb. 5.6.1b

Abb. 5.6.1: Endomyokardiale Biopsie eines Patienten mit DCM in der Interferenz-Kontrast-Mikroskopie

a) nukleäre DNA-Fragmentation nach der TUNEL-Methode

b) Autofluoreszenzbetrachtung desselben Ausschnittes

Schwarzes Dreieck: TUNEL- stark positiver Kern mit leicht reduzierter Eigenfluoreszenz der Zelle

Schwarzer Pfeil: TUNEL- positiver Kern mit stark reduzierter Eigenfluoreszenz der Zelle

Weißer Pfeil: TUNEL- schwach positiver Kern mit leicht eingeschränkter Eigenfluoreszenz

Weißes Dreieck: TUNEL- negative Herzmuskelzelle mit intakter Eigenfluoreszenz

5.6.2 Ergebnisse der Transglutaminase-Färbung

Die Bestimmung der Transglutaminaseexpression erfolgte bei 92 Patienten. Durchschnittlich konnte auf $13,0 \pm 6,5$ % der ermittelten Gesamtzellfläche der Nachweis des Apoptosemarker TTG erbracht werden. Der prozentuale Anteil der Transglutaminaseexpression an der Gesamtzellfläche lag abhängig von Patient und Gesichtsfeld zwischen 2,8 und 33 %. Die Bearbeitung eines Ausschnittes zeigt die Abbildung 5.6.2.

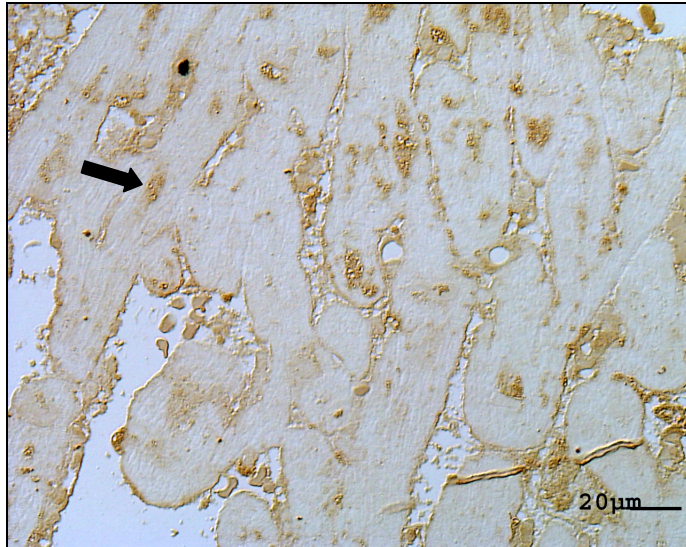


Abb. 5.6.2a

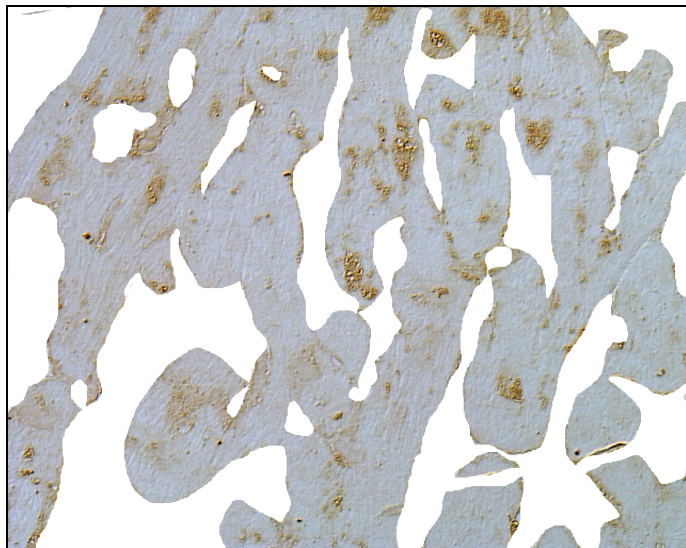


Abb. 5.6.2b

Abb. 5.6.2: Endomyokardiale Biopsie eines Patienten mit einer Myokarditis in der Interferenz Kontrast Mikroskopie

- a) Original; schwarzer Pfeil: Transglutaminasenachweis
- b) Schablone zur Flächenbestimmung und Auswertung des prozentualen Anteils an TTG

5.7 Apoptoseindex im Vergleich zur Schwere der Herzinsuffizienz

5.7.1 Auswertung der Transglutaminase-Färbung

Betrachtet man die Ausprägung der Transglutaminase-Färbung innerhalb der beiden Herzinsuffizienzgruppen I und II, so zeigt sich ein signifikant ($p < 0,01$) höherer Anteil des Apoptosemarkers TTG bei Patienten der Gruppe II. So betrug der prozentuale Anteil an tissue Transglutaminase Expression in der Gruppe der Patienten mit leichter Herzinsuffizienz durchschnittlich $11,2 \pm 5,9$ %, wohingegen Patienten der Gruppe II im Mittel $19,2 \pm 8,6$ % an Transglutaminase aufwiesen (siehe Abbildung 5.7.1).

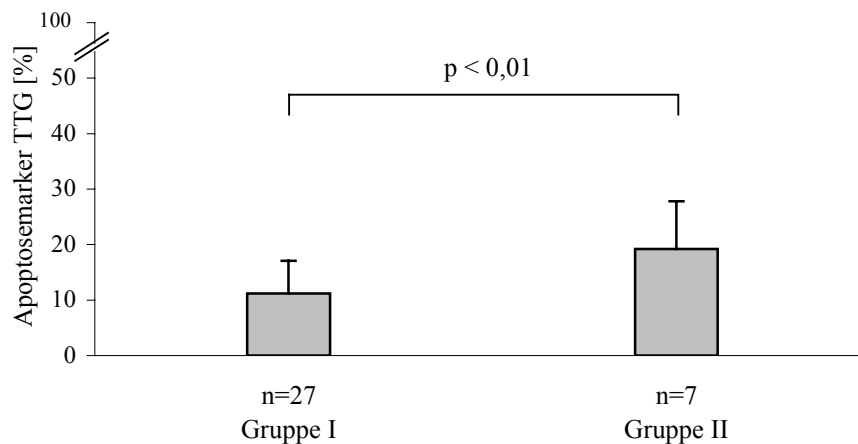


Abb. 5.7.1: Apoptosemarker TTG in den Herzinsuffizienzgruppen I und II

5.7.2 Auswertung der TUNEL-Methode

Vergleicht man die Herzinsuffizienzgruppe I mit der Gruppe II hinsichtlich der DNA-Fragmentation in der TUNEL-Färbung, zeigt sich bei Patienten der Gruppe I zwar eine niedrigere Anzahl an stark positiven Zellkernen ($1,63 \pm 2,5$ % in der Gruppe I vs. $1,88 \pm 2,1$ % in der Gruppe II), der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Abbildung 5.7.2 stellt dieses Ergebnis graphisch dar.

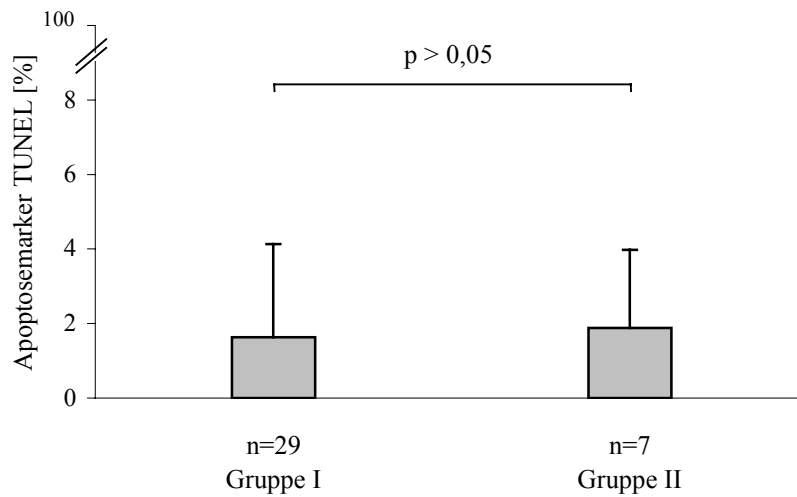


Abb. 5.7.2: TUNEL stark positive Kerne in den Herzinsuffizienzgruppen I und II

5.8 Zusammenhang zwischen Cardiotrophin-1 und Apoptose im Herzen

Korreliert man die Ergebnisse aus den Apoptosefärbungen mit den jeweiligen Cardiotrophin-1 Spiegeln im Serum der Patienten, so zeigt sich bei Betrachtung beider Apoptosemarker (tissue Transglutaminase und TUNEL-Methode) kein signifikanter Zusammenhang mit den Cardiotrophin-1 Messwerten (Daten nicht gezeigt).

5.9 CT-1 in der Genese der Herzinsuffizienz: DCM versus inflammatorische Kardiomyopathie

Von den 138 Patienten dieser Studie konnte bei 113 Patienten histologisch die Diagnose einer DCM oder einer inflammatorischen Kardiomyopathie gestellt werden. Die deskriptive Statistik der Patienten dieser Diagnosegruppen stellt sich folgendermaßen dar:

Tab. 5.9: Klinische Daten der Patienten mit dem Diagnoseschlüssel einer DCM bzw. inflammatorischen Kardiomyopathie

	DCM	Inflammatorische Kardiomyopathie	p
Anzahl Patienten	86	27	
Alter in Jahren	48,7 ± 12,0	43,4 ± 15,3	n.s.
Männliches Geschlecht	73	21	n.s.
Weibliches Geschlecht	13	6	n.s.
BMI [kg/m ²]	27,6 ± 5,0	25,8 ± 4,0	n.s.
Echo EF [%]	31 ± 12	42 ± 13	< 0,001
LVEDD [mm]	66,1 ± 8,5	59,5 ± 7,8	n.s.
Lävokardiographie EF [%]	35 ± 14	48 ± 17	< 0,001
BNP [pg/ml]	376,1 ± 441,3	153,7 ± 201,9	< 0,05
CT-1 [fmol/ml]	27,7 ± 75,8	11,7 ± 16,9	n.s.

Vergleicht man die Patienten mit der Diagnose einer dilatativen Kardiomyopathie mit denen der Diagnose einer inflammatorischen Kardiomyopathie, so zeigt sich zwar ein erhöhter CT-1 Spiegel in der Gruppe der Patienten mit einer DCM (27,7 ± 75,8 fmol/ml vs. 11,7 ± 16,9 fmol/ml), der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (n.s.).

5.10 Apoptoserate in der Herzinsuffizienz: DCM versus inflammatorische Kardiomyopathie

Betrachtet man die Apoptoserate innerhalb der Gruppe der Patienten mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie und vergleicht diese mit den Ergebnissen der Patienten mit der Diagnose einer DCM, so stellt man keinen signifikanten Unterschied fest. Dieses Ergebnis gilt sowohl für den Apoptosemarker TTG als auch für die TUNEL-Methode. Bei Betrachtung des Markers Transglutaminase beträgt die jeweilige Apoptoserate 13,1 ± 6,7 % in der Gruppe der Patienten mit einer DCM vs. 11,5 ± 6,1 % in der Gruppe der Patienten mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie. Bei Betrachtung der Apoptoserate in der TUNEL-Methode zeigt

sich für die Gruppe der Patienten mit einer DCM eine Rate von $1,5 \pm 2,0$ % positiver Zellen vs. $1,9 \pm 2,1$ % positiver Zellen in der Gruppe der Patienten mit einer ICM (siehe Abbildung 5.10).

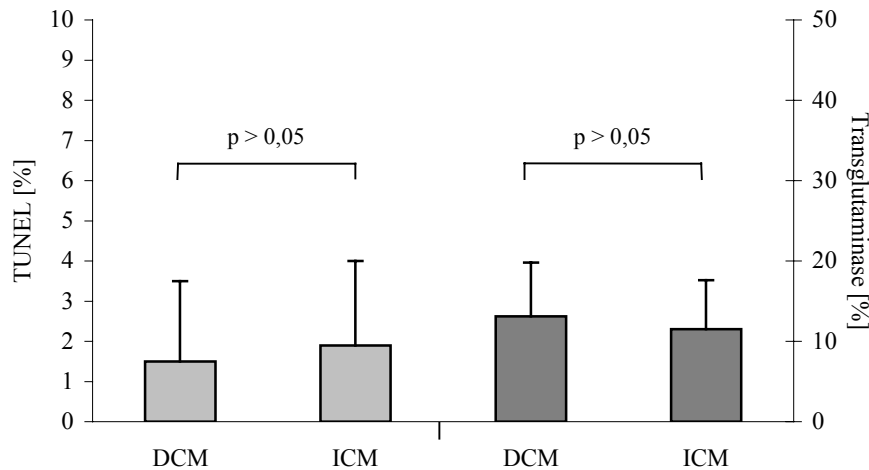


Abb. 5.10: Apoptoserate in der Herzinsuffizienz: DCM versus inflammatorische Kardiomyopathie

5.11 Ergebnisse der Enterovirusanalyse

Die Ergebnisse der Enterovirusanalyse zeigten bei 23 Patienten (30 %) einen positiven und bei 54 Patienten (70 %) einen negativen Enterovirusstatus.

5.11.1 Einfluss des Enterovirusstatus auf die Cardiotrophinexpression im Serum

Vergleicht man die Enterovirus positiven mit den Enterovirus negativen Patienten bezüglich des CT-1 Spiegels im Serum, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,5$). Der gemessene Zytokinspiegel liegt in der Gruppe der Virus positiven Patienten bei $37,6 \pm 89,3$ fmol/l und in der Virus negativen Gruppe bei $25,3 \pm 72,6$ fmol/l (siehe Abbildung 5.11.1).

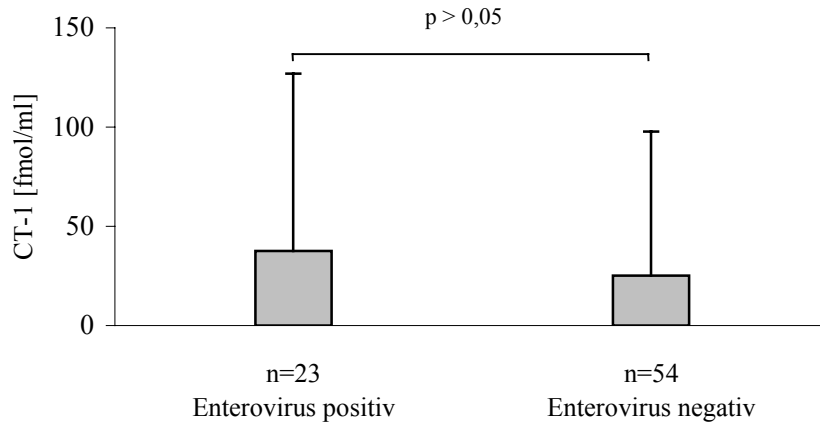


Abb. 5.11.1: CT-1 im Serum bei Enterovirus positiven und Enterovirus negativen Patienten

5.11.2 Einfluss des Enterovirusstatus auf die Apoptose im Myokard

Vergleicht man die Enterovirus positiven und die Enterovirus negativen Patientengruppen hinsichtlich des Ausmaßes an DNA-Fragmentation in den Myokardzellen, so lässt sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) bezüglich den TUNEL stark positiven Kernen in den beiden Gruppen erkennen (Virus positive Patienten: $1,5 \pm 2,1$ % vs. Virus negative Patienten: $1,3 \pm 1,9$ %).

Auch bei Betrachtung der Expression an Transglutaminase konnten wir keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) hinsichtlich der beiden Gruppen feststellen (Virus positive Patienten: $15,1 \pm 6,3$ % vs. Virus negative Patienten: $12,0 \pm 6,6$ %).

Abbildung 5.11.2 veranschaulicht die Ergebnisse.

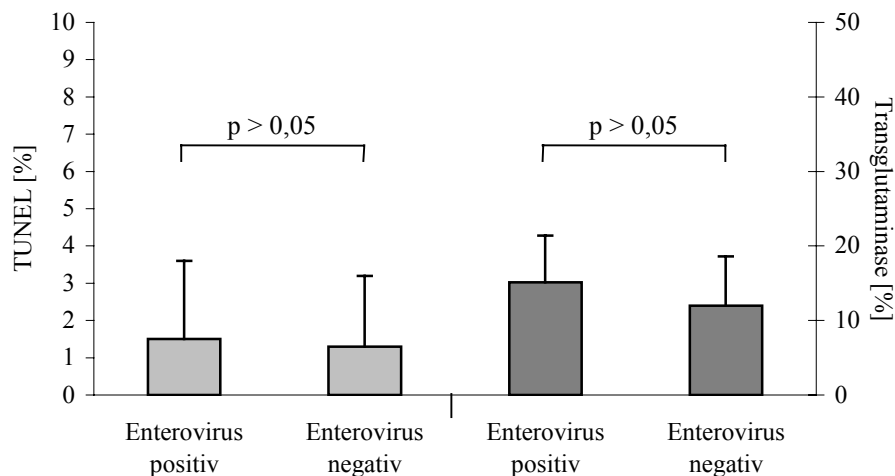


Abb. 5.11.2: Einfluss des Enterovirusstatus auf die Apoptose im Myokard

6 Diskussion

6.1 CT-1 und der Rezeptor gp130 in der Herzinsuffizienz

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass schwer herzinsuffiziente Patienten signifikant erhöhte CT-1 Spiegel im Serum aufweisen. Die vermehrte Expression des Zytokins CT-1 bei herzinsuffizienten Patienten konnte bereits in mehreren Arbeiten aufgezeigt werden (Talwar et al. 1999, Ng et al. 2002, Zolk et al. 2002). Alle bisherigen Untersuchungen beziehen sich jedoch auf Vergleiche mit einem gesunden Kontrollgut. Anhand unserer Datenlage können wir aufzeigen, dass der CT-1 Spiegel im Serum mit dem Ausmaß der Herzinsuffizienz assoziiert ist, wobei das Zytokin CT-1 mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung vermehrt exprimiert wird.

Experimentelle Untersuchungen lassen vermuten, dass die in der Herzinsuffizienz verstärkte CT-1 Expression einen Anpassungsversuch des Herzmuskelgewebes an die veränderte Belastungssituation darstellt: Als Reaktion auf die bei der Herzinsuffizienz erhöhte Druck- und Volumenbelastung ist eine gesteigerte Pumpleistung des Herzens erforderlich, welche u.a. durch eine Hypertrophie des Herzmuskelgewebes gewährleistet werden kann. Diese kompensatorische Hypertrophie wird durch die vermehrte Expression des Zytokins CT-1 induziert. CT-1 trägt somit zur Aufrechterhaltung der erforderlichen Pumpleistung zu Beginn der Herzinsuffizienz bei.

Für die weitere Entwicklung und Entstehung einer Herzinsuffizienz ist der sich an die Hypertrophie anschließende Umbauprozess des Herzens entscheidend, welcher zu einer irreversiblen Dilatation und darauffolgenden Dekompensation des Herz- Kreislaufsystems führt (Böhm 2002). In diesem Zusammenhang konnten Toh et al. an herzinsuffizienten Dahl salt-sensitive Ratten zeigen, dass der Transfer von CT-1 exprimierenden Myoblasten zu einer hypertrophen Kompensation des Herzens führt, die Entstehung einer Herzinsuffizienz aus dieser jedoch zu verhindern hilft (Toh et al. 2004). Als entscheidender Mechanismus, der sich positiv bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz auswirke, wird von den Autoren eine durch das Zytokin CT-1 vermittelte herabgesetzte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron- und des Endothelinsystems beschrieben.

Es ist anzunehmen, dass die in unserer Studie erhöhte Expression von CT-1 bei schwer herzinsuffizienten Patienten, ähnlich dem BNP, direkt durch eine erhöhte ventrikuläre Wandspannung getriggert wird. Den entscheidenden Hinweis dafür liefert eine Untersuchung von Talwar et al. an Patienten mit einer Aortenstenose (Talwar et al. 2001). Aufgrund ihrer Er-

krankung waren die Patienten einer stark erhöhten Druckbelastung bzw. Wandspannung des linken Ventrikels ausgesetzt. Die Messung von CT-1 im Serum dieser Patienten zeigte im Vergleich zu gesunden Probanden einen signifikant erhöhten Zytokinspiegel.

Der „mechanische Stress“ scheint allerdings nur ein Faktor für eine vermehrte CT-1 Expression darzustellen. Eine in unserer Studie nicht signifikante Korrelation zwischen den CT-1 Spiegeln im Serum und den Ergebnissen der BNP Messung lässt weitere Trigger des Zytokins CT-1 in der Herzinsuffizienz vermuten.

Denkbar wäre zudem eine mögliche Induktion von CT-1 durch andere Zytokine oder Botenstoffe. So konnten Sano et al. eine vermehrte Expression der mRNA von CT-1 in kardialen Fibroblasten nach Stimulation durch Angiotensin-II nachweisen (Sano et al. 2000). Ein komplexes Netzwerk an in vivo ablaufenden Regulationsvorgängen lässt in unserem Studienaufbau Rückschlüsse auf einzelne Mechanismen kaum zu. Zu berücksichtigen wäre zudem, dass sich in unserem Studienkollektiv Patienten unterschiedlichen Geschlechts und Alters mit einer mehr oder weniger schweren Herzerkrankung befanden. Ein derart heterogenes Patientenkollektiv, bei dem in unterschiedlicher Weise eine Vielzahl an Kompensations- und Regulationsmechanismen ablaufen, erschwert die Betrachtung einzelner Regulationsvorgänge erheblich.

Der Signalweg von CT-1 über den Rezeptor gp130

Die Wirkungsentfaltung des Zytokins CT-1 erfolgt über die Rezeptoruntereinheit gp130. Wollert et al. konnten in „in vitro“ Studien nachweisen, dass die hypertrophe Wirkung von CT-1 an Myozyten über den gp130/LIFR (leukemia inhibitory factor Rezeptorkomplex) induziert wird (Wollert et al. 1996). In unserer Untersuchung haben wir den löslichen gp130 Rezeptor im Serum der Patienten bestimmt. Der Rezeptor sgp130 korreliert dabei mit dem gp130 Membranprotein (Aukrust et al. 1999).

Wir konnten zeigen, dass der lösliche gp130 Rezeptor im Plasma der Patienten mit einer schweren Herzinsuffizienz signifikant erhöht ist. Eine vermehrte CT-1 Expression bei schwerer Herzinsuffizienz scheint bei Betrachtung unserer Ergebnisse mit einer Induktion des Signalweges über den gp130 Rezeptor einherzugehen. Im Vergleich mit der bestehenden Literatur überrascht unser Ergebnis, da dort eine verstärkte CT-1 Expression mit dem Einhergang eines verminderten Membranproteins gp130 beschrieben wird. So untersuchten Zolk et al. an einem Patientenkollektiv terminal herzinsuffizienter Patienten den Zusammenhang zwischen der CT-1 Genexpression und dem Vorkommen des Rezeptors gp130. Interessanterweise war im Myokard der herzinsuffizienten Patienten im Vergleich mit gesunden Probanden zwar eine

erhöhte gp130 mRNA Expression zu finden, jedoch war das Vorkommen des Proteins gp130 selbst signifikant erniedrigt (Zolk et al. 2002).

Auch Podewski et al. kamen zu dem Ergebnis, dass eine vermehrte Bildung von CT-1 mit der Suppression des gp130 Rezeptors einhergeht und eine überschießende Aktivierung des gp130 Signalweges dadurch unterbunden wird (Podewski et al. 2003).

Die unterschiedlichen Resultate schließen sich jedoch nicht aus, wenn man bedenkt, dass sowohl Zolk als auch Podewski das Protein gp130 direkt in den Myozyten (Western-Blot bzw. Immunblot) bestimmt haben, in unserer Untersuchung aber der lösliche gp130 Rezeptor im Serum gemessen wurde. Es ist bekannt, dass der Rezeptor gp130 ubiquitär in fast allen Organen exprimiert wird (Saito et al. 1992, Taga und Kishimoto 1997). Denkbar und zu untersuchen wäre daher, ob der von uns im Serum gemessene gp130 Rezeptor gar nicht in erster Linie durch kardiale Myozyten, sondern vielmehr vorrangig durch andere Zellen, wie beispielsweise Endothelzellen, Fibroblasten und Immunzellen gebildet wird. Dies könnte in unserer Studie den erhöhten sgp130 Spiegel im Plasma schwer herzinsuffizienter Patienten erklären.

Unsere Ergebnisse zeigen keine signifikante Korrelation zwischen dem Zytokin CT-1 und dem Rezeptor gp130. Eine Korrelation zwischen beiden Parametern ist jedoch auch nicht zu erwarten, da neben Cardiotrophin-1 auch andere Zytokine der Interleukin-6 Familie die Rezeptoruntereinheit gp130 zur Signaltransduktion nutzen (Wollert et al. 1996, Yoshida et al. 1996) und somit gleichermaßen auf die gp130 Expression Einfluss nehmen.

CT-1 in der Prognose der Herzinsuffizienz

Bei Betrachtung der Sterblichkeit in den beiden Herzinsuffizienzgruppen ergab sich nach einem vierjährigen Beobachtungszeitraum mit 40 % eine signifikant erhöhte Sterberate in der Gruppe der schwerst kranken Patienten. Patienten dieser Gruppe zeigten auch signifikant höhere Serumkonzentrationen von CT-1. Anhand unserer Ergebnisse lässt sich spekulieren, dass Cardiotrophin-1 einen prognostisch ungünstigen Faktor in der Herzinsuffizienz darstellt.

Die frühzeitige Diagnosestellung einer Herzinsuffizienz kann zur besseren Therapie und Prognose der Erkrankung erheblich beitragen. In diesem Zusammenhang konnten Jougasaki et al. am Tiermodell zeigen, dass bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz die Genaktivierung von Cardiotrophin-1 noch vor der Genaktivierung von BNP im Ventrikelmyokard nachweisbar ist (Jougasaki et al. 2003). Eine Funktion von CT-1 als frühen Herzinsuffizienzmarker wäre daher durchaus denkbar.

6.2 CT-1 in seiner Wirkung als antiapoptotisches Zytokin

Der apoptotische Untergang von Herzmuskelgewebe stellt einen weiteren Aspekt in der Herzinsuffizienz dar: Verschiedene Tiermodelle zeigen eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von Apoptose und der Entstehung einer Herzinsuffizienz (Liu et al. 1995, Kubota et al. 1997, Hirota et al. 1999). Auch im Myokard terminal herzinsuffizienter Patienten konnte ein vermehrter Nachweis apoptotischer Kardiomyozyten erbracht werden (Narula et al. 1996, Olivetti et al. 1997, Yamamura et al. 1999).

Erstmals 1996 konnten Sheng et al. in einem Modell an Zellkulturen eine Inhibition der Apoptose im Herzen durch Cardiotrophin-1 aufzeigen: Die Inkubation von neonatalen Kardiomyozyten der Ratte mit CT-1 führte zu einer erhöhten Überlebensrate der Zellen und einer signifikanten Reduktion des Ausmaßes an positiven Kernen in der TUNEL-Färbung (Sheng et al. 1996). Dieses Ergebnis konnten von Liao et al. an adulten Kardiomyozyten ex vivo bestätigt werden (Liao et al. 2002). In einer Untersuchung von Ruixing et al. führte die vorherige Gabe von CT-1 an Ratten, welche eine Woche später einen iatrogenen Herzinfarkt erleiden sollten, zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose im Herzen (Ruixing et al. 2004). Besonders unter Stressbedingungen scheint der antiapoptotische und zytoprotektive Effekt des Zytokins CT-1 zum Tragen zu kommen (Hirota et al. 1999, Ruixing et al. 2004).

Der antiapoptotische Signalweg von Cardiotrophin-1 erfolgt dabei zunächst über die Bindung an den gp130/LIF Rezeptorkomplex. Im Weiteren kommt es über eine Aktivierung von PI3K und der Proteinkinase Akt zu einer vermehrten Aktivierung der Bcl-2 Familie, einer Gruppe von Proteinen des Apoptosezyklus (Kuwahara et al. 2000, Negoro et al. 2001). So gelang es Ruixing et al. die Inhibition der proapoptotisch wirkenden zytoplasmatischen Proteine P53, Fas und Bax mit einer verstärkt nachweisbaren Expression des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 Proteins durch CT-1 aufzuzeigen. Ebenso scheint die Aktivierung des p42/p44 MAPK Signalwegs an der antiapoptotischen Wirkungsweise des Zytokins beteiligt zu sein (Liao et al. 2002).

Die beschriebene antiapoptotische Wirkung von CT-1 suchten wir mit unserer Patientenstudie erstmals für in vivo Voraussetzungen zu beschreiben: Mit zunehmendem Ausmaß der Herzinsuffizienz war sowohl eine vermehrte Rate an apoptotischen Kardiomyozyten als auch ein erhöhter CT-1 Spiegel im Serum zu verzeichnen. Der Gedankengang liegt nahe, dass die Zunahme der Apoptose in der Herzinsuffizienz zu einer gegenregulatorischen Induktion des Zytokins CT-1 beiträgt. In solch einem Fall würde man in irgendeiner Weise eine Korrelation der beiden Parameter erwarten. Der Vergleich der CT-1 Werte im Serum der einzelnen Patienten mit den Ergebnissen der Apoptosefärbungen zeigte in unserer Studie allerdings keinen

signifikanten Zusammenhang. Das Ergebnis verdeutlicht einmal mehr die Problematik, die im (tier)-experimentellen Modell gefundenen Effekte von CT-1 auf die komplexen in vivo ablaufenden Regelkreise am Patienten zu übertragen. Zu berücksichtigen wäre vor allem, dass wir in unserer Studie kein gesundes Kontrollkollektiv zur Verfügung hatten. Eine Vielzahl von im Kranken Organismus ablaufenden Regulationsvorgängen erschwert die Beurteilung einzelner Faktoren in unserer Studie erheblich. So könnte sowohl die unterschiedliche Erkrankungsdauer als auch das abweichende Lebensalter und Geschlecht der Patienten zu einer Beeinflussung der Ergebnisse beigetragen haben. Die Literatur beschreibt beispielsweise mit zunehmendem Lebensalter (Kajstura et al. 1996, Warner 1997, Higami und Shimokawa 2000, Bernecker et al. 2003) wie auch unter Einfluss des Zytokins TNF α (Krown et al. 1996, Oral et al. 1997) eine erhöhte Rate an apoptotischen Zellen. Zudem scheinen etwa Östrogene einen apoptoseprotektiven Effekt auf die Kardiomyozyten auszuüben (Guerra et al. 1999). Im Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Cardiotrophin-1 in der Lage ist Apoptose fördernde Zytokine, wie beispielsweise TNF α , zu inhibieren (Benigni et al. 1996). Letztendlich zu berücksichtigen ist auch die unterschiedliche medikamentöse Anbehandlung der Patienten, welche sowohl die Zytokinfreisetzung als auch die Apoptose beeinflussen kann (Gurlek et al. 2001, Mann 2002, McGowan et al. 2003). So gelang es Kajstura et al. in einem Kulturexperiment an kardialen Myozyten die antiapoptotische Wirkung von AT-1 Blockern hervorzuheben (Kajstura et al. 1997). In anschließenden Studien konnte auch für Arzneimittel aus der Gruppe der ACE-Hemmer und β -Blocker eine antiapoptotische Wirkungsweise in der Herzinsuffizienz aufgezeigt werden (Goussev et al. 1998, Feuerstein et al. 1998, Communal et al. 1999, Sabbah et al. 2000). In diesem Zusammenhang wäre noch auf die variable und schwer überprüfbare Medikamentencompliance der Patienten hinzuweisen.

Ein in unserer Studie nicht nachweisbarer direkter Zusammenhang zwischen CT-1 und der Apoptose im Myokard könnte auch damit erklärt werden, dass in unserer Untersuchung die CT-1 Messung im Serum der Patienten durchgeführt wurde. Vergleichende Messungen des CT-1 Spiegels im zirkulierendem Blut, gewonnen aus dem Sinus coronarius, der Aorta und der Vena femoralis, konnten hingegen zeigen, dass das Herz mit dem Sinus coronarius die Hauptquelle der CT-1 Produktion darstellt (Asai et al. 2000). Es ist daher anzunehmen, dass die intrakoronar wirksame CT-1 Konzentration viel höher ist als die von uns bestimmte CT-1 Konzentration in der peripheren Zirkulation, wo ein Teil des CT-1 möglicherweise bereits abgebaut ist.

An Zellkulturen der Ratte konnten Kuwahara et al. nachweisen, dass CT-1 sowohl von Kardiomyozyten als insbesondere aber auch von kardialen Fibroblasten gebildet wird (Kuwahara et

al. 1999). Zytokine weisen eine parakrine und autokrine Wirkungsweise auf, können aber auch endokrin wirken (Baumgarten et al. 2004). Geht man von einer überwiegend autokrinen Wirkung von CT-1 aus (Sheng et al. 1996), so würde dieses Zytokin zu einem Großteil an "Nichtmyozyten" wirken. In unserer Studie haben wir jedoch nur die Apoptoserate der Myozyten berücksichtigt. Einen direkten Zusammenhang zwischen der myozytären Apoptoserate und dem in unserer Studie peripher gemessenen CT-1 Serumspiegel erscheint auch unter Berücksichtigung dieser Überlegungen eher unwahrscheinlich.

Nach den Ergebnissen unserer Studie könnte die antiapoptotische Wirkung von CT-1 mit einem pathophysiologischen Ansatz erklärt werden: Aufgrund der in der Herzinsuffizienz erhöhten Druckbelastung und einer zusätzlichen Triggerung durch das Zytokin Cardiotrophin-1 steigt die Expression der natriuretisch wirkenden Peptide ANP und BNP (Ishikawa et al. 1997, Harada et al. 1998, Kuwahara et al. 1998, Hamanaka et al. 2000, Jougasaki et al. 2003). Dabei wird die verstärkte Genexpression dieser beiden Peptide einerseits indirekt durch die hypertrophierende Wirkung von CT-1 induziert (Harada et al. 1997, Takahashi et al. 2005), sehr wahrscheinlich spielt aber auch eine direkte Stimulation eine Rolle (Hamanaka et al. 2000, Jougasaki et al. 2003). Über die erhöhte ANP und BNP Expression trägt Cardiotrophin-1 zu einer vermehrten Natriurese und Diurese bei. Diese vermag den Druck im Ventrikel zu senken. Erniedrigte Druckverhältnisse verringern die Wandspannung des Ventrikels und wirken somit indirekt der Apoptose entgegen.

Mit zunehmender Schwere der Herzinsuffizienz war in unserer Untersuchung ein erhöhter CT-1 Spiegel im Serum der Patienten zu verzeichnen. In der Gruppe der schwer herzinsuffizienten Patienten zeigte sich allerdings auch eine vermehrte Apoptoserate der Kardiomyozyten. Letztendlich ist zu überlegen, ob das Zytokin CT-1 in dieser Konstellation nicht auch eine apoptosefördernde Funktion ausübt, indem mit zunehmender Hypertrophie der Herzmuskelzellen eine ausreichende Versorgung der Myozyten nicht mehr gewährleistet werden kann. Es folgt eine Ischämie der Myozyten, welche den Apoptosezyklus in Gang zu setzen vermag. Letztere Überlegungen berücksichtigend verdeutlicht sich noch einmal die Schwierigkeit in „in vivo Studien“ einzelne Signalwege verfolgen zu wollen.

6.3 Apoptose in der Herzinsuffizienz und Diskussion der Methoden

In unserer Untersuchung haben wir die Apoptoserate im Myokard anhand der beiden Apoptosemarker Transglutaminase und TUNEL bestimmt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass schwer herzinsuffiziente Patienten vermehrt Apoptose im Herzmuskelgewebe aufweisen. Das Ergebnis erweist sich jedoch nur im Hinblick auf den Apoptosemarker Transglutaminase als signifikant.

Bisher konnte nicht geklärt werden, ob die erhöhte Rate an apoptotischen Zellen die Entstehung einer Herzinsuffizienz wesentlich mitbegründet, oder ob die Apoptose doch eher als Reaktion auf die veränderten Bedingungen in der Herzinsuffizienz zu sehen ist.

Eine erhöhte Rate an apoptotischen Zellen führt zu einem Untergang von Myozyten und resultiert somit in einer verschlechterten Leitungs- und Leistungsfähigkeit des Myokardgewebes, einem bedeutenden Merkmal der Herzinsuffizienz (Feuerstein 2001).

Die andere Überlegung geht dahin, dass die erhöhte Apoptoserate in der Herzinsuffizienz erst durch die erhöhte Druckbelastung mit anschließender Dilatation und Remodeling im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung hervorgerufen wird, indem die Herzmuskelzellen derart beansprucht und in ihrer Integrität verändert werden, dass sie aus dem Gewebeverband eliminiert werden müssen. So konnten Condorelli et al. an einem Modellversuch einer Aortenstenose bei Ratten eine erhöhte Rate an apoptotischen Kardiomyozyten 18 Wochen nach der Operation aufzeigen (Condorelli et al. 1999). Die Ursache der vermehrten Apoptose sahen die Autoren in einer erhöhten Druckbelastung des Herzmuskelgewebes begründet. Auch andere Studien belegen eine Induktion der Apoptose durch eine mechanische Belastung und Überdehnung des Herzmuskels (Cheng et al. 1995, Teiger et al. 1996, Leri et al. 1998, Pan et al. 1999, Kang und Izumo 2000, Wencker et al. 2003).

Eine erhöhte Druck- und Volumenbelastung als Ursache einer vermehrten Apoptoserate ist bei Betrachtung unserer Ergebnisse durchaus wahrscheinlich. Ebenso könnte die erhöhte Rate an apoptotischen Zellen aber auch mit dem signifikant höheren Lebensalter der Patienten in der Herzinsuffizienzgruppe II in Zusammenhang gebracht werden (Kajstura et al. 1996, Warner 1997, Higami und Shimokawa 2000).

Die in unserer Patientenstudie anhand des Apoptosemarkers Transglutaminase gemessene signifikant erhöhte Rate an apoptotischen Zellen in der Gruppe der schwer herzinsuffizienten Patienten suggeriert, dass mit dem neueren Apoptosemarker Transglutaminase ein der TUNEL-Methode möglicherweise überlegener Marker gefunden worden ist. Im Hinblick auf unsere Untersuchung lässt sich sagen, dass die Auswertung der histochemischen Färbungen

bei Betrachtung des Apoptosemarkers Transglutaminase mit Hilfe des ImageJ Programms eindeutig standardisierter erfolgen konnte. Dahingegen unterlag die Auswertung der TUNEL-Methode viel stärker einer Subjektivität: Die Abgrenzung zwischen intaktem, apoptotischem und nekrotischem Myozyt gestaltete sich aufgrund unspezifischer und nicht eindeutiger Färbungsergebnisse oft schwierig, und die Auswertung der einzelnen Ausschnitte schwankte innerhalb einer Gewebeprobe unter Betrachtung der TUNEL-Methode weit mehr als bei Auswertung der Transglutaminasefärbungen.

Der prozentuale Anteil gesamt positiver Zellen in der TUNEL-Methode liegt abhängig vom Patienten und betrachtetem Gewebeausschnitt in unserer Studie zwischen 0 – 76 %. Durchschnittlich lag dieser Wert bei 11,2 %. Eine derart hohe Apoptoserate ist unter der Vorstellung, dass die Apoptose ein terminaler Prozess ist, der mit dem Tod der Zelle einhergeht, kaum zu halten. Besonders unter der Annahme, dass der apoptotische Vorgang ein Prozess ist, der nur wenige Stunden dauert (Bursch 1992, Saraste et al. 1999, Anversa und Nadal-Ginard 2002), würde nach einem Zeitraum von mehreren Tagen annähernd das gesamte Herzmuskelgewebe apoptotisch untergegangen sein. Unsere Ergebnisse der TUNEL-Methode legen daher die Vermutung nahe, dass eine nicht unerhebliche Anzahl an Kardiomyozyten „falsch“ positiv markiert wurden.

In der Literatur wird die TUNEL-Methode als sehr anfällig für Störfaktoren beschrieben. Methodische Probleme bei der Gewebefixation und das Ausmaß an Proteolyse in den Zellen würden nicht selten zu falsch positiven als auch falsch negativen Ergebnissen führen (Pankuweit et al. 1999, Saraste 1999, Kang und Izumo 2000). Ein weiteres Problem der TUNEL-Methode besteht darin, dass sie nicht spezifisch für apoptotische DNA-Fragmente ist. Das Enzym terminale Transferase im TUNEL-assay bindet an alle 3'OH Enden von DNA-Fragmenten, wobei auch DNA-Schäden in onkotischen bzw. nekrotischen Zellen als auch Reparaturvorgänge an der DNA eine unspezifische TUNEL-Reaktion hervorrufen (Gold et al. 1994, Yasuda 1995, Ohno et al. 1998, Kanoh et al. 1999). Ebenso kann eine aktive Synthese und ein "Splicing" von RNA eine unspezifische TUNEL-Reaktion verursachen (Kockx et al. 1998, Knaapen et al. 2001). Koda et al. konnten zudem eine signifikante Korrelation zwischen TUNEL-positiv markierten Myozyten und einer Hypertrophie des Herzmuskels belegen (Koda et al. 2003). Insbesondere letztere Studie könnte die in unserer Arbeit zum Teil sehr hohe Rate an „TUNEL-positiven Zellen gesamt“ erklären.

Einfluss der Genese der Herzinsuffizienz auf die Apoptose

In einer Untersuchung von Alter et al. an Endomyokardbiopsien von Patienten mit einer chronischen Myokarditis im Vergleich mit Patienten der Diagnose einer DCM zeigte sich in der Myokarditisgruppe eine ungefähr 10-fach höhere Rate an apoptotischen Zellen in der TUNEL-Färbung (Alter et al. 2001). Den Autoren zufolge scheint die Apoptose abhängig vom Ausmaß der Gewebeinflammation zu sein.

Anhand unserer Datenlage lässt sich dieses Ergebnis nicht bestätigen: Es zeigte sich bei Betrachtung beider Marker kein signifikanter Unterschied bezüglich der Apoptoserate in der Gruppe der Patienten mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie im Vergleich mit denjenigen Patienten mit einer DCM. Wie bereits erwähnt gelingt es mit unserem Studienaufbau nur ansatzweise einzelne pro- und antiapoptotische Signalwege herauszuarbeiten. Die Diskrepanzen zu der Untersuchung von Alter et al. sind sowohl durch die Unterschiede in der Anwendung der Apoptosemarker als auch durch das heterogene Patientengut in unserer Studie erklärbar. Die in unserer Untersuchung vergleichbar hohe Apoptoserate könnte etwa in der Gruppe der inflammatorischen Kardiomyopathie entzündungsbedingt und in der Gruppe der DCM Patienten durch ein höheres Lebensalter oder einer bereits länger bestehenden Anamnese mit erhöhter Volumen- und Druckbelastung erklärt werden.

Einfluss einer Virusinfektion auf die Apoptose

Der Frage nachgehend, welchen Einfluss eine schleichende Virusinfektion auf die Apoptose im Herzen haben könnte, untersuchten Lotze et al. 31 Myokardproben von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (Lotze et al. 2001). Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte einen signifikant niedrigeren Anteil apoptotischer Myozyten in der Gruppe der Enterovirus-positiven Patienten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Alter et al., welche den Einfluss einer Enterovirusinfektion auf die Apoptose anhand der TUNEL-Methode bei der Myokarditis und der DCM untersuchten (Alter et al. 2001). Die Autoren erklärten diesen Befund mit dem in der Apoptoseforschung beschriebenen Konzept viraler Proteine, welche als Inhibitoren der Apoptose fungieren können (Tolskaya et al. 1995, Gillet und Brun 1996, Schwarz et al. 1998). Mit einer deutlich größeren Patientenzahl und einer standardisierten und objektiveren Auswertung suchten wir den Einfluss einer persistierenden Enterovirusinfektion auf die Apoptose in der Herzinsuffizienz zu bestätigen: Bei ähnlichen Untersuchungsmethoden konnten wir keinen signifikanten Unterschied innerhalb der beiden Gruppen (Enterovirus-positiv bzw. Enterovirus-negativ) verzeichnen. Bei einer Vielzahl von pro- und antiapoptotischen Faktoren, die in vivo eine Rolle spielen, bestätigen diese unterschiedlichen Ergebnisse erneut die

Schwierigkeit, den Einfluss einzelner Parameter auf die Apoptose in einem derartigen Studienaufbau zu beurteilen.

6.4 CT-1 in der Genese der Herzinsuffizienz

In der Entstehung der Herzinsuffizienz spielt die Myokarditis durch die Triggerung von Immunmechanismen pathogenetisch eine Rolle. Eine Aktivierung des Immunsystems spiegelt sich unter anderem in der Zytokinexpression wider. Experimentelle Untersuchungen an mit Coxsackie B virusinfizierten Mäusen konnten zeigen, dass eine myokardiale Entzündung mit einer verstärkten Expression von CT-1 assoziiert ist (Okuno et al. 2000). Die infizierten Mäuse entwickelten anschließend das Krankheitsbild einer akuten Myokarditis. Den Autoren dieser Studie zufolge übe CT-1 bei einer Virusmyokarditis eine kardioprotektive Wirkung aus, indem das Zytokin die Immunantwort beeinflusst und die Kardiomyozytenproliferation fördert. Bisher ist nicht geklärt, ob die vermehrte Expression von CT-1 möglicherweise durch eine virale Induktion oder etwa durch eine erhöhte Anzahl Entzündungszellen im Myokard getriggert wird.

Eine persistierende Virus-RNA gilt als potentieller Promotor einer fortbestehenden Gewebeeinfiltration des Myokards durch T-Lymphozyten in der chronischen Phase einer Myokarditis. Belegt werden konnte dies daran, dass immunkompetente Mäusestämme, in denen enterovirale RNA persistiert, eine chronische Myokarditis entwickelten, während DBA/1 Mäuse, die virale RNA frühzeitig eliminieren, nicht zu einer Chronifizierung neigen (Klingel et al. 1992). In unserer Studie ließ sich bei 30 % der Patienten ein Virusgenom nachweisen. Um den Einfluss einer derartigen Viruspersistenz auf die Zytokinexpression zu überprüfen, untersuchten wir die CT-1 Werte im Serum in Abhängigkeit von einem in den Herzmuskelzellen persistierenden viralen Genom. Hierbei ließ sich in unserer Studie nicht nur für Patienten aus der inflammatorischen Kardiomyopathiegruppe, sondern gleichfalls auch für Patienten mit der Diagnose einer dilatativen Kardiomyopathie ein virales Genom in den Herzmuskelzellen nachweisen. Ein signifikanter Unterschied in der CT-1 Expression der Enterovirus-positiven bzw. Enterovirus-negativen Patienten zeigte sich dabei jedoch nicht. Der Einfluss einer chronisch schleichenden Virusinfektion auf die Expression von Cardiotrophin-1 erscheint daher nachrangig, zumal noch nicht einmal gesichert ist, inwieweit ein persistierendes virales Genom überhaupt mit der Herzerkrankung im Zusammenhang steht (Maisch et al. 1993).

Um den Einfluss einer Entzündungsreaktion auf die CT-1 Expression zu untersuchen, verglichen wir die CT-1 Werte der Myokarditispatienten mit denen einer DCM: Die Expression von Cardiotrophin-1 in unserer Studie zeigte hinsichtlich der Genese der Erkrankung keinen signi-

fikanten Unterschied und die Vermutung liegt nahe, dass es für die CT-1 Expression andere Triggerfaktoren gibt. Letztendlich mündet eine virale wie auch eine anderweitig verursachte Entzündung des Myokards häufig in das Endbild einer Kardiomyopathie (Kawai 1999, Liu et al. 2005), so dass vor allem der unterschiedlich lange Krankheitsverlauf in der Genese der Erkrankung eine Rolle zu spielen scheint.

Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass die CT-1 Expression nicht vordergründig abhängig ist von der Genese bzw. dem Pathomechanismus der Erkrankung, sondern vielmehr durch den Schweregrad der Herzinsuffizienz beeinflusst wird. Inwieweit dabei etwa neurohumorale Faktoren oder andere Zytokine eine Rolle spielen, gilt es weiter zu erforschen.

7 Schlussfolgerungen

Erste Versuche eines therapeutischen Einsatzes des Zytokins CT-1 sind bisher nur auf tierexperimenteller Ebene erfolgt, zeigten allerdings durchaus vielversprechende Ergebnisse. So führte die intravenöse Gabe von CT-1 an Ratten über eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zu einer erhöhten Auswurfleistung des Herzens sowie einem erniedrigten arteriellen Blutdruck (Jin et al. 1998). Die Transplantation von CT-1 exprimierenden Myoblasten konnte bei Ratten die Herzinsuffizienzrate im Vergleich zu der nicht CT-1 exprimierenden Kontrollgruppe signifikant verringern (Toh et al. 2004). Anschließende Studien an Herzinfarktmodellen lassen für CT-1 sowohl eine kardiale Schutz- als auch Reparaturfunktion vermuten, wobei unter anderem die Beeinflussung der Angiogenese eine bedeutende Rolle zu spielen scheint (Freed et al. 2005).

Die in der Literatur beschriebenen Effekte von CT-1 sprechen vornehmlich für eine kardioprotektive Potenz dieses Zytokins in der Herzinsuffizienz. Es existieren jedoch neuere Daten, die vermuten lassen, dass das Zytokin Cardiotrophin-1 auch an einer Progression der Herzinsuffizienz beteiligt sein könnte. So konnte in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) eine Induktion des MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) durch Cardiotrophin-1 aufgezeigt werden. Das Protein MCP-1 wird dabei über eine entzündungsunterhaltende Funktion für das Fortschreiten der Herzinsuffizienz mit verantwortlich gemacht, wobei der Signalweg einer vermehrten MCP-1 Expression Überschneidungen mit dem bekannten JAK/STAT Mechanismus zeigt (Fritzenwanger et al. 2006). Es zeigt sich, dass die genaue Kenntnis der verschiedenen Signalwege von Cardiotrophin-1 von entscheidender Bedeutung ist, um gezielt in die Signaltransduktion und Wirkungsentfaltung dieses Zytokins eingreifen zu können.

Eine frühzeitige Diagnosestellung der Herzinsuffizienz kann zur besseren Therapie und Prognose der Erkrankung erheblich beitragen. Ob Cardiotrophin-1 sich in diesem Zusammenhang als Herzinsuffizienzmarker eignet, gilt es daher weiter zu erforschen. Sich dieser Arbeit anschließende Studien könnten etwa das „Outcome“ der Patienten mit einer klinisch ähnlich schweren Herzinsuffizienz, jedoch unterschiedlicher CT-1 Expression untersuchen.

8 Literaturverzeichnis

Adams KF, Mathur VS, Gheorghiade M (2003)
“B-Type natriuretic peptide: From bench to bedside“
Am Heart J 2003;145:S34-46.

Aeschlimann D et Thomazy V (2000)
“Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases“
Connect. Tissue Res. 2000; 41, 1-27.

Alter P, Jobmann M, Meyer E, Pankuweit S, Maisch B (2001)
“Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy: Does enterovirus genome persistence protect from apoptosis? – An endomyocardial biopsy study“
Cardiovasc. Pathology 10 (2001) 229-234.

Anker SD, Egerer KR, Volk HD, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ (1997)
“Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure“
Am J Cardiol 1997;79:1426-1430.

Anversa P et Nadal-Ginard B (2002)
“Myocyte renewal and ventricular remodelling“
Nature 2002;415:240-3

Anversa P (1998)
“Myocyte apoptosis and heart failure“
Eur. Heart J. 19: 359-360

Anversa P et Kajstura J (1998)
“Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart“
Circ. Res. 1998; 83, 1-14.

Asai S, Saito Y, Kuwahara K, Mizuno Y, Yoshimura M, Higashikubo C, Tsuji T, Kishimoto I, Harada M, Hamanaka I, Takahashi N, Yasue H, Nakao K (2000)
“The heart is a source of circulating cardiotrophin-1 in humans“
Biochem Biophys Res Commun. 2000; 279: 320-323.

Aschoff AP, Günther E, Jirikowski GF (2000)
“Tissue transglutaminase in the small intestine of mouse as a marker of apoptotic cells. Colocalization with DNA fragmentation“
Histochem Cell Biol 2000;113-7.

Aschoff AP, Jantz M, Jirikowski GF (1996)
“In-situ end labelling with bromodeoxyuridine - an advanced technique for the visualization of apoptotic cells in histological specimens“
Horm. Metab. Res. 1996, 28:311-314.

- Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Muller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aass H, Espevik T, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L (1999)
“Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy”
Am J Cardiol 1999; 83:376-82.
- Autuori F, Farrace MG, Oliviero S, Piredda L, Piacentini M (1998)
“Tissue transglutaminase and apoptosis”
Adv Biochem Eng Biotechnol 1998; 62:129-36.
- Baumgarten G, Grohe A, Hoeft A, Knuefermann P (2004)
“Cytokines and heart failure”
Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2004; 197-203.
- Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P (1994)
“Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans”
Circulation. 1994 Jan;89(1):151-63.
- Benigni F, Sacco S, Pennica D, Ghezzi P (1996)
“Cardiotrohin-1 inhibits tumor necrosis factor production in the heart and serum of lipopolysaccharide-treated mice and in vitro in mouse blood cells”
AJP (1996) Vol. 119 No.6:1847-1850.
- Bernecker OY, Huq F, Heist EK, Podesser BK, Hajjar RJ (2003)
“Apoptosis in heart failure and the senescent heart”
Cardiovascular Toxicology (2003); 3:183-190.
- Bewley MC, Springer K, Zhang Y, Freimuth P, Flanagan JM (1999)
“Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR”
Science (1999) 286:1579-1583.
- Böhm M (2002).
“ Pathophysiologie der Herzinsuffizienz heute“
Herz 27 (2): 75-91.
- Bouhour JB, Langlard JM, Kopecka H, Petitjean J, Freymuth F (1993)
“Virus and dilated cardiomyopathies”
Arch Mal Coeur Vaiss. 1993 Feb;86 Spec No 2:15-20
- Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, Archard LC (1986)
“Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy”
Lancet. 1986 May 17;1(8490):1120-3.
- Braunwald E (1994)
In “Pathophysiology of heart failure”
Braunwald E, (Saunders, Philadelphia) Vol.14,393-402.

-
- Bristow M et Long C (2002)
“Cardiotrophin-1 in Heart Failure”
Circulation Vol.106(12)1430-1432.
- Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R (1992)
“Cell death by apoptosis and its protective role against disease”
Trends Pharmacol Sci. 1992;6:245-51.
- Calabrese F, van der Wal AC, Levi M (2003)
“Infection and inflammation in the cardiovascular system”
Cardiovasc Res Editorial 60:1-4 (2003).
- Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P (1995)
“Stretch-induced programmed myocyte cell death”
J Clin Invest 1995;96:2247-59.
- Chomczynski P et Sacchi N (1987)
“Single-Step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction”
Anal Biochem 1987;162:156-59.
- Cohn JN, Levine TB, Francis GS, Goldsmith S (1981)
“Neurohumoral control mechanisms in congestive heart failure”
Am. Heart J. 102: 509-514
- Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS (1999)
“Opposing effects of beta(1)- and beta(2)- adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin G protein”
Circulation 100: 2210-2212
- Condorelli G, Morisco C, Stassi G, Notte A, Farina F, Sgaramella G, de Rienzo A, Roncarati R, Trimarco B, Lembo G (1999)
”Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat”
Circulation 99(23):3071-3078.
- Cowie MR, Wood DA, Coats AJS, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC (1999)
“Incidence and aetiology of heart failure – a population based study”
Eur Heart J 20:421-428
- Cummings M (1996)
“Apoptosis of epithelial cells in vivo involves tissue transglutaminase upregulation”
J Pathol. 1996, 179(3):288-93.
- Dominguez LJ, Parrinello G, Amato P, Licata G (1999)
“Trends of congestive heart failure epidemiology: contrast with clinical trial results”
Cardiologia 1999; 44(9):801-8.

-
- Drexler H, Riede U, Munzel T, König H, Funke E, Just H (1992)
“Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure”
Circulation 1992, 85(5):1751-9.
- Elsässer A, Suzuki K, Schaper J (2000).
“Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure”
J Mol Cell Cardiol 2000(5):711-24.
- Erdmann E et Böhm M (1996)
Klinische Kardiologie
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York 4. Aufl. (1996).
- Erdmann E, Bolte HD, Strauer BE, Hübner G (1980).
“Myokardiale Beteiligung bei M. Fabry”
Dtsch Med Wochenschr. 105:1618-1622.
- Feldman AM et McNamara D (2000)
“Myocarditis”
N Engl J Med. 2000 Nov 9;343(19):1388-98.
- Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK (2000)
“Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy”
N Engl J Med 342 (15):1077-1084.
- Fernandez-Sola J, Estruch R, Grau JM, Pare JC, Rubin E, Urbano-Marquez A (1994)
“The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy”
Ann Intern Med. 1994 Apr 1;120(7):529-36.
- Fesus L et Piacentini M (2002)
“Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions”
Trends Biochem. Sci.27,534-539 (2002).
- Fesus L, Davies PJA, Piacentini M (1991).
“Molecular mechanisms in the program of cell death by apoptosis”
Eur. J. Cell Biol. 56: 170-177.
- Fesus L, Thomazy V, Falus A (1987)
“Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death”
FEBS Lett. 224, 104-108 (1987).
- Feuerstein GZ (2001)
“Apoptosis-new opportunities for novel therapeutic for heart diseases”
Cardiovasc. Drug Ther. 15: 547-551.
- Feuerstein GZ, Yue TL, Ma X, Ruffolo RR (1998)
“Novel mechanisms in the treatment of heart failure: inhibition of oxygen radicals and apoptosis by carvedilol”
Prog. Cardiovasc. Dis. 41:17-24.

-
- Francis GS (1991)
“Heart failure in 1991”
Cardiology 78(2):81-94.
- Freed D, Cunningham R, Dangerfield A, Sutton J, Dixon I (2005)
“Emerging evidence for the role of cardiotrophin-1 in cardiac repair in the infarcted heart”
Cardiovasc Res. 2005 Mar 1;65(4):782-92.
- Fritzenwanger M, Kueth F, Haase D, Jandt E, Figulla HR (2006)
“Cardiotrophin-1 induces monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human umbilical vein endothelial cells”
Cytokine. 2006 Jan 7;33(1):46-51.
- Fukuzawa J, Booz GW, Hunt RA, Shimizu R, Karoor V, Baker KM, Dostal DE (2000)
“Cardiotrophin-1 increases angiotensinogen mRNA in rat cardiac myocytes through STAT3: an autocrine loop for hypertrophy”
Hypertension 2000;35:1191-1196.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992)
“Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation”
J. Cell. Biol. 119: 493-501.
- Gerdes AM et Capasso JM (1995)
“Structural remodelling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure”
J. Mol. Cell. Cardiol. 27, 849-856.
- Ghosh S, Ng LL, Talwar S, Squire IB, Galinanes M (2000)
“Cardiotrophin-1 protects the human myocardium from ischemic injury. Comparison with the first and second window of protection by ischemic preconditioning”
Cardiovasc Res. 2000;48(3):440-7.
- Gillet G et Brun G (1996)
“Viral inhibition of apoptosis”
Trends Microbiol. 1996 Aug;4(8):312-7.
- Goette A, Lendeckel U, Klein HU (2002)
“Signal transduction systems and atrial fibrillation”
Cardiovasc. Res. 54 (2002) 247-258.
- Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka K, Lassmann H (1994)
“Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques”
Lab Invest. 1994;2:219-25.
- Goussev A, Sharov VG, Shimoyama H, Tanimura M, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN (1998)
“Effects of ACE inhibition on cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure”
Am J Physiol 272. H626-631.

- Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH (1991)
“Transglutaminase: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues“
FASEB J. 5: 3071-3077.
- Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loeto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P (1999)
“Myocyte death in the failing human heart is gender dependent”
Circ.Res. 1999 Oct 29; 85:856-866.
- Gurlek A, Kilickap M, Dincer I, Dandachi R, Tutkak H, Oral D (2001)
“Effect of losartan on circulating TNFalpha levels and left ventricular systolic performance in patients with heart failure”
J Cardiovasc Risk. 2001 Oct;8(5):279-82.
- Hamanaka I, Saito Y, Nishikimi T, Magaribuchi T, Kamitani S, Kuwahara K, Ishikawa M, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Shirakami G, Mori K, Inobe Y, Kishimoto K, Masuda I, Fukuda K, Nakao K (2000).
” Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and endocrine function of the heart”
AJP – Heart and Circulatory Physiology 2000; 279(1):H388.
- Harada M, Saito Y, Kuwahara K, Ogawa E, Ishikawa M, Nakagawa O, Miyamoto Y, Kamitani S, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Masuda I, Itoh H, Nakao K (1998)
“Interaction of myocytes and nonmyocytes is necessary for mechanical stretch to induce ANP/BNP production in cardiocyte culture“
J Cardiovasc Pharmacol. 1998;31 Suppl 1:357-9.
- Harada M, Saito Y, Nakagawa O, Miyamoto Y, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Nakayama M, Kamitani S, Hamanaka I, Kajiyama N, Masuda I, Itoh H, Tanaka I, Nakao K (1997)
“Role of cardiac nonmyocytes in cyclic mechanical stretch-induced myocyte hypertrophy”
Heart Vessels 1997; Suppl 12:198-200.
- Haunstetter A et Izumo S (1998)
“Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease“
Circ Res 1998;82:1111-29.
- Hess OM (2003)
“Herzinsuffizienz: Definition, Ursachen und Formen“
Schweiz Med Forum Nr. 48 Nov. 2003.
- Van Heugten HAA et Lamers MJM (1997)
“changes in cardiac phenotype in hypertrophy and failure: from receptor to gene”
Heart Failure Reviews 1997;2:95-106.
- Higami Y et Shimokawa I (2000)
“Apoptosis in the aging process”
Cell Tissue Res. 301:125-132.
- Hirota H, Chen J, Betz UAK, Rajewsky K, Ross YJ, Müller W, Chien KR (1999)
“Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress“
Cell 97: 189-198.

Hobbs R et Boyle A (2002)

“Heart failure“

The Cleveland Clinic May 29, 2002

Hoes AW, Mosterd A, Grobbee DE (1998)

“An epidemic of heart failure?“

European Heart Journal 1998;19 Supplement L, L2-L8.

Hong BK, Kwon HM, Byun KH, Kim D, Choi EY, Kang TS, Kang SM, Chung KJ (2000)

“Apoptosis in dilated cardiomyopathy“

Korean J Intern Med 2000;15:56-64.

Hoppe UC et Erdmann E (2001)

“Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz“

Z Kardiologie 2001; 90: 218–37

Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schönian U, Maisch B (2000)

“The European study of epidemiology and treatment of cardiac inflammatory diseases (ESETCID)“

Herz 25, 2000; 3:279-85.

Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW (2001)

“ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult“

Journal of the American College of Cardiology Dec, 2001

Hunter JJ et Chien KR (1999)

“ Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure”

N Engl J Med. 1999;341:1276-1283.

Ishikawa M, Miyamoto Y, Kuwahara K (1997)

“Cardiotrophin-1, a new agonist for a gp130 signaling pathway, stimulates brain natriuretic peptide secretion more abundantly than endothelin-1

Circulation 96 (Suppl.), 362-I.

James TN (1994)

“Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias“

Circulation 90: 556-573.

Jin H, Yang R, Ko A, Pennica D, Wood WI, Paoni NF (1998)

“Effects of cardiotrophin-1 on haemodynamics and cardiac function in conscious rats”

Cytokine. 1998 Jan;10(1):19-25.

Jin H, Yang R, Keller GA, Ryan A, Ko A, Finkle D, Swanson TA, Li W, Pennica D, Wood WI, Paoni NF (1996)

“In vivo effects of cardiotrophin-1”

Cytokine (1996) 8;12:920-926.

- Jones WK (2003)
“Focus issue: cell death in the heart”
Cardiovascular Toxicology (2003) 03:179-182.
- Jougasaki M, Leskinen H, Larsen AM, Luchner A, Cataliotti A, Tachibana I, Burnett J (2003)
“Ventricular Cardiotrophin-1 activation precedes BNP in experimental heart failure”
Peptides 24 (2003) 889-892.
- Jougasaki M, Tachibana I, Luchner A, Leskinen H, Redfield MM, Burnett JC (2000)
“Augmented cardiac Cardiotrophin-1 in experimental congestive heart failure”
Circulation 2000;101:14-7.
- Kajstura J, Leri A, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Anversa P (2004).
“Myocyte growth in the failing heart”
Surg Clin North Am. 84(1):161-177.
- Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P (1997)
“Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro”
J. Mol. Cell. Cardiol. 29:859-870.
- Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P (1996)
“Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats”
Am. J. Physiol. 271: H1215-1228.
- Kandolf R (1998)
“Enterovirale Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie”
Medizinische Klinik 1998;93:215-22.
- Kandolf R, Klingel K, Zell R, Selinka HC, Raab U, Schneider-Brachert W, Bultmann B (1993)
“Molecular pathogenesis of enterovirus-induced myocarditis: virus persistence and chronic inflammation”
Intervirology 1993;35:140-151.
- Kang PM et Izumo S (2000)
“Apoptosis and heart failure. A critical review of the literature”
Circ Res 2000;86:1107-13.
- Kannel WB, Plehn JF, Cupples A (1988)
“Cardiac failure and sudden death in the Framingham Study”
Am Heart J 115:869-875.
- Kanoh M, Takemura G, Miaso J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H (1999)
“Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair”
Circulation 1999: 2757-2764.

- Katz AM (2002)
“Heart Failure: Pathophysiology, molekular biology, and clinical management”
2nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia.
- Kawano H, Okada R, Kawano Y, Sueyoshi N, Shirai T (1994)
“Apoptosis in acute and chronic myocarditis”
Jpn Heart J. 1994;6:745-50.
- Kawai C (1999)
“From myocarditis to cardiomyopathy: mechanism of inflammation and cell death: learning from the past to future”
Circulation 1999 Mar.2;99(8):1091-100.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972)
“Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics”
Br J Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57.
- King KL, Lai J, Winer J, Luis E, Yen R, Hooley J, Williams PM, Mather JP (1996)
“Cardiac fibroblasts produce leukemia inhibitory factor and endothelin, which combine to induce cardiac myocyte hypertrophy in vitro”
Endocrine. 1996;5:85-93.
- Kishimoto T (2005)
“IL-6: from laboratory to bedside”
Clin Rev Allergy Immunol. 2005 Jun;28(3):177-86.
- Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R (1992)
“Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage and inflammation”
Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89(1):314-318.
- Knaapen MWM, Davies MJ, De Bie M, Haven AJ, Martinet W, Kockx MM
“Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure”
Cardiovasc. Res. 51(2001)304-312.
- Knight CR, Rees RC, Platts A, Johnson T, Griffin M (1993)
“Interleukin-2-activated human effector lymphocytes mediate cytotoxicity by inducing apoptosis in human leukemia and solid tumor target cells”
Immunology 1993;4:535-41.
- Kockx MM, Muhring J, Knaapen MWM, De Meyer GRY (1998)
“RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis”
Am J Pathol 1998;152:885-888.
- Koda M, Takemura G, Kanoh M, Hayakawa K, Kawase Y, Maruyama R, Li Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (2003)
“Myocytes positive for in situ markers for DNA breaks in human hearts which are hypertrophic, but neither failed nor dilated: a manifestation of cardiac hypertrophy rather than failure.
J Pathol. 2003 Feb;199(2):229-36.

- Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJE, Sabbadini RA (1996)
“Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes: involvement of the shingolipid signaling cascade in cardiac cell death“
J. Clin. Invest. 1996; 98:2854-2865.
- Kubota T, Mc Tiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM (1997)
“Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha”
Circ Res 1997;81:627-35.
- Kumar D, Lou H, Singal PK (2002)
“Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction”
Herz 2002;27:662-668.
- Kuwahara K, Saito Y, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Nakao K (2000)
“Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a P13K-dependent pathway in cardiac myocytes“
J. Moll. Cell. Cardiol. 32: 1385-1394.
- Kuwahara K, Saito Y, Harada M, Ishikawa M, Ogawa E, Miyamoto Y, Hamanaka I, Kamitani S, Kajiyama N, Takahashi N, Nakagawa O, Masuda I, Nakao K (1999)
“Involvement of cardiotrophin-1 in cardiac myocyte - nonmyocyte interactions during hypertrophy of rat cardiac myocytes in vitro“
- Kuwahara K, Saito Y, Ogawa Y, Tamura N, Ishikawa M, Harada M, Ogawa E, Miyamoto Y, Hamanaka I, Kamitani S, Kajiyama N, Takahashi N, Nakagawa O, Masuda I, Nakao K
”Endothelin-1 and cardiotrophin-1 induce brain natriuretic peptide gene expression by distinct transcriptional mechanisms” (1998)
J Cardiovasc Pharmacol 31 Suppl1:354-356.
- Lee SC, Stevens TL, Sandberg SM, Heublein DM, Nelson SM, Jougasaki M, Redfield MM, Burnett JC Jr (2002)
“The potential of brain natriuretic peptide as a biomarker for New York Heart Association class during outpatients treatment of heart failure“
J Cardiac Fail 2002;8:149-54.
- Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P (1998)
“Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte-apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin-system and decreases the bcl-2 to bax protein ratio in the cell“
J Clin Invest 1998;101:1326-42.
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M (1990)
“Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure“
N. Engl. J. Med. 323: 236-241.

Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS (2002)

“Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure”

N Engl J Med. 2002 Oct 31;347(18):1397-402

Liao Z, Brar KB, Cai Q, Stephanou A, O’Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS (2002)

“Cardiotrophin-1 can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion“

Cardiovasc. Res. 53 (2002) 902-910.

Liu Z, Yuan J, Yanagawa B, Qiu D, McManus BM, Yang D (2005)

“Coxsackie-induced myocarditis: new trends in treatment.”

Expert Rev Anti Infect Ther. 2005 Aug;3(4):641-50.

Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze TH, Anversa P (1995)

“Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs.”

Lab Invest 1995;73:771-87.

Lopez N, Diez J, Fortuno MA (2005)

“Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against nonischemic death stimuli in adult cardiomyocytes”

Cytokine 2005, Jun 7;30(5):282-92.

Lotze U, Busch HJ, Aschoff A, Glück B, Sigusch H, Jirikowski G, Stelzner A, Figulla HR, (2001)

“Damaged myocytes as detected by the colocalization of DNA fragmentation and tissue transglutaminase and their prognostic significance in enterovirus-associated dilated cardiomyopathy“

European Journal of Clinical Investigation 2001;31, 744-755.

Luchner A, Holmer S, Schunkert H, Riegger GA (2003).

“Bedeutung der Herzinsuffizienzmarker BNP und NT-pro BNP für die Klinik“

Deutsches Ärzteblatt 100, Ausgabe 50 vom 12.12.2003, A 3314-21.

Maisch B, Ristic AD, Portig I, Pankuweit S (2003)

“Human viral cardiomyopathy”

Front Biosci. 2003 Jan.1;8:s39-67.

Maisch B, Ristić AD, Hufnagel G, Funck R, Alter P, Tontsch D, Pankuweit S (2002a)

“Dilated Cardiomyopathie as a Cause of Congestive Heart Failure“

Herz 2002;27:113-34.

Maisch B, Ristić AD, Hufnagel G, Pankuweit S (2002b)

“Pathophysiology of viral myocarditis- The role of humoral response“

Cardiuvascular Pathology 11(2002)112-122.

-
- Maisch B, Portig I, Ristić AD, Hufnagel G, Pankuweit S (2000)
“Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus- a status report“
Herz 2000;25:200-9.
- Maisch B (1999)
Editorial zur “Apoptose und kardiale Erkrankung“
Herz 1999;24:181-8 (Nr.3).
- Maisch B, Schonian U, Crombach M, Wendl I, Bethge C, Herzum M, Klein HH (1993)
“Cytomegalovirus associated inflammatory heart muscle disease“
Scand J Infect Dis 1993;88:135-148
- Maisch B (1989)
“Retrospective and perspectives in the immunology of cardiac diseases”
Springer Semin Immunopathol. 1989;11(4):479-82.
- Maisch B, Bauer E, Hufnagel G, Pfeifer U (1988)
“The use of endomyocardial biopsy in heart failure“
Eur Heart J 9:59-71.
- Maisel A (2001)
“B-type natriuretic peptide levels: a potential novel „white-count“ for congestive heart failure“
J of Cardiac Failure 2001; 7: 183-193.
- Mann DL (2002)
“Inflammatory mediators and the failing heart: past, present and the foreseeable future”
Circ. Res. 2002; 91:988-998.
- Mann DL, Deswal A, Bozkurt B, Torre-Amione G (2002)
“New therapeutics for chronic heart failure“
Annu Rev Med 2002;53:59-74.
- Mark DB et Felker GM (2004)
“B-type natriuretic peptide- a biomarker for all seasons ?”
N Engl J Med 2004;350;7:718-720.
- Martino TA, Liu P, Sole MJ (1994)
“Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy“
Circulation research 1994 Vol 74, 182-188.
- McGowan BS, Ciccimaro EF, Chan TO, Feldman AM (2003).
“The balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways in the failing myocardium“
Cardiovascular Toxicology (2003) 03, 191-205
- McKenna CJ, Codd MB, McCann HA, Sugrue DD (1998)
“Alcohol consumption and idiopathic dilated cardiomyopathy: a case-control study“
Am Heart J 1998;135:833-7.

McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Klingel KE, Beisel KW, Kandolf R (1993)

“Direct myokardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myokarditis“

Clin Immunol Immunopathol 68:159-169.

Melino G et Piacentini M (1998)

'Tissue' transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effector“

FEBS Lett. 1998 Jun 23;430(1-2):59-63.

Nagy L, Thomazy V, Dacies PJA (1994).

“Transglutaminases: effector molecules in physiologic cell death“

Cancer Bull. 46: 136-140.

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA (1996)

“Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure“

N. Engl. J. Med. 335:1182-9.

Negoro S, Oh H, Tone E, Kunisada K, Fujio Y, Walsh K, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K (2001)

“Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicininduced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction“

Circulation 103: 555-561.

Ng LL, O'Brien RJ, Demme B, Jennings S (2002)

“Non-competitive immunochemiluminometric assay for cardiotrophin-1 detects elevated plasma levels in human heart failure“

Clin Sci. 2002; 102: 411-416.

Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, Poole-Wilson PA, Coats AJ, Anker SD (1999)

“Endotoxine and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study“

Lancet 1999;353: 1838-1842.

Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (1998)

“Apoptotic myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: Analysis by immunogold electron microscopy combined with in situ nick end labeling“

Circulation 1998: 1422-1430.

Okuno M, Nakagawa M, Shimada M, Saito M, Hishinuma S, Yamauchi-Takahara K (2000)

“Expression patterns of cytokines in a murine model of acute myocarditis: early expression of Cardiotrophin-1“

Laboratory Investigation Vol.80,No.3,433-441.

Olbrich H-G (2001)

“Epidemiologie- Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie“

Z Kardiologie 90: Suppl 1,I/2-I/9 (2001) Steinkopff Verlag 2001

- Oliverio S, Amendola A, Rodolfo C, Spinedi A, Piacentini M (1999)
“Inhibition of “tissue“ Transglutaminase increases cell survival by preventing apoptosis“
J Biol Chem, Vol. 274, Issue 48, 34123-34128.
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Loreto CD, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P (1997)
“Apoptosis in the failing human heart“
N. Engl. J. Med. 1997;336:1131-1141.
- Oral H, Dorn GW, Mann DL (1997)
“Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte“
J Biol Chem 1997; 272:3836-42.
- Oral H, Kapadia S, Nakano M, Torre-Amione G, Lee J, Lee-Jackson D, Young JB, Mann DL (1995)
“Tumor necrosis factor-alpha and the failing human heart“
Clin. Cardiol. 18, Suppl 4:20-7.
- Packer M (1996)
“New concepts in the pathophysiology of heart failure: beneficial and deleterious interaction in endogenous haemodynamic and neurohormonal mechanisms”
J. Intern. Med. 239(4): 327-333.
- Pan J, Fukuda K, Saito M, Matsuzaki J, Kodama H, Sano M, Takahashi T, Kato T, Ogawa S (1999)
“Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes“
Circ. Res. 1999;84:1127-36.
- Pankuweit S, Jobmann M, Crombach M, Portig I, Alter P, Kruse T, Hufnagel G, Maisch B (1999)
“Cell death in inflammatory heart muscle diseases- apoptosis or necrosis“
Herz 24 (3) : 211-8.
- Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kühl U, Schwimmbeck P, Schultheiss HP, Towbin JA (1999)
“Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction
Circulation. 1999 Mar 16;99(10):1348-54.
- Pennica D, Wood WI, Chien KR (1996)
“Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp130 dependent pathways“
Cytokine Growth Factor Rev. 7:81-91.
- Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, Moore MW, Shelton DL, Zioncheck KA, Rosenthal A, Taga T, Paoni NF, Wood WI (1995a)
“Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex“
J Biol Chem. 1995; 270: 10915-10922.

- Pennica D, King KI, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh S, Darbonne WC, Knutzon DS, Yen R, Chien KR, Baker JB, Wood WI (1995b)
“Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy”
Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92: 1142-1146.
- Piacentini M (1995)
“Tissue transglutaminase. A candidate effector element of physiological cell death”
Curr Top Microbiol Immunol 1995;200:163-75.
- Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Melino G,(1991)
“The expression of tissue transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis)”
Eur Journal of Cell Biol 54,246-254.
- Piredda L, Farrace MG, Bello ML, Malorni W, Melino G, Petruzzelli R, Piacentini M (1999)
“Identification of tissue transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis”
FASEB Journal 1999; 13:355-64.
- Podewski EK, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Morawietz H, Lichtenberg A, Wollert KC, Drexler H (2003)
“Alterations in Janus Kinase (JAK) Signal Transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy”
Circulation Vol 107(6) 798-802.
- Poole-Wilson PA (2002)
“Death or Repair of the Myocyte in Chronic Heart Failure”
Editorial Comment, Journal of Am. College of Cardiology 2002; Vol.40 No. 6.
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O’Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsfas I, Martin I, Nordet P (1996)
“Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies, news see comments”
Circulation 1996;93:841-2.
- Richardson PJ (1980)
“Endomyocardial biopsy technique”
In: Bolte HD (ed) Myocardial biopsy; Springer Verlag
- Robledo O, Fourcin M, Chevalier S, Guillet C, Auguste P, Pouolard-Barthelaix A, Pennica D, Gascan H (1997)
“Signaling of the cardiotrophin-1 receptor”
The journal of biological chemistry Vol.272,8:4855-4863.
- Rose NR, Herskowitz A, Neumann DA (1993)
“Autoimmunity in Myokarditis: Models and Mechanisms”
Clin Immunol Immunopathol 68:95-99.

Ruixing Y, Dezhai Y, Jiaquan L (2004)

“Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and cardiomyocyte apoptosis in rats with acute myocardial infarction”

J Med Invest. 2004(1-2):29-37.

Sabbah HN, Sharov VG, Gupta RC, Todor A, Singh V, Goldstein S (2000)

Chronic therapy with metoprolol attenuates cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure”

J. Am. Coll. Cardiol. 36:1698-1705.

Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T (1992)

Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo.

J Immunol. 1992;148:4066-4071.

Sano M, Fukuda K, Kodoma H, Pan J, Saito M, Matsuzaki J, Takahashi T, Makino S, Kato T, Ogawa S (2000)

“Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes”

J Biol Chem. 2000 Sep 22;275(38):29717-23.

Saraste A (1999)

“Morphologic criteria and detection of apoptosis“

Herz 1999;24:189-95.

Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki (1997)

“Apoptosis in human acute myocardial infarction“

Circulation 95: 320-323.

Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K (1999)

“The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy“

Herz 1999;24:219-24.

Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N (1991)

“Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathie“

Circulation 83: 504-514.

Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, Krammer PH (1994)

“Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis“

J Cell Biol 1994;127:15-20.

Schwaiger A, Umlauf F, Weyrer K, Larcher C, Lyone J, Muhlberger V, Dietze O, Grunewald K (1993)

“Detection of enteroviral ribonucleic acid in myocardial biopsies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by polymerase chain reaction“

Am Heart J 1993;126:406-10.

- Schwarz EM, Badorff C, Hiura TS, Wessely R, Badorff A, Verma IM, Knowlton KU (1998)
“NF-kappaB-mediated inhibition of apoptosis is required for encephalomyocarditis virus virulence: a mechanism of resistance in p50 knockout mice”
J Virol. 1998 July; 72(7): 5654–5660.
- Sheng Z, Knowlton K, Chen J, Hoshijima M, Brown JH, Chien KR (1997)
“Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway: divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy”
J Biol Chem. 1997; 272: 5783-5791.
- Sheng Z, Pennica D, Wood WI, Chien KR (1996)
“Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival”
Development 122; 419-428 (1996)
- Staudt A, Landsberger M, Staudt Y, Felix SB (2002)
“Die Rolle der Zytokine bei der Herzinsuffizienz”
Herz 2002;27:691-8.
- Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJV (2001)
“More „malignant“ than cancer ? Five-year survival following a first admission for heart failure”
Europ J Heart Fail 3 (2001) 315-322.
- Taga T et Kishimoto T (1997)
“gp130 and the interleukin-6 family of cytokines”
Annu. Rev. Immunol. 1997. 15:797-819.
- Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Tanimoto K, Nakagawa Y, Kawakami R, Nakanishi M, Yasuno S, Usami S, Yoshimura A, Nakao K (2005)
“Hypertrophic response to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes”
J Moll Cell Cardiol. 2005 Jan;38(1):185-92.
- Talwar S, Downie PF, Squire IB, Davies JE, Barnett DB, Ng LL (2001)
“Plasma N-terminal pro BNP and cardiotrophin-1 are elevated in aortic stenosis”
Eur J Heart Fail. 2001;3(1):15-9.
- Talwar S, Squire IB, Downie PF, O’Brien RJ, Davies JE, Ng LL (2000)
“Elevated circulating cardiotrophin-1 in heart failure: relationship with parameters of left ventricular systolic dysfunction”
Clin Sci. 2000; 99:83-88.
- Talwar S, Downie PF, Squire IB, Barnett DB, Davies JD, Ng LL (1999)
“An immunoluminometric assay for cardiotrophin-1: a newly identified cytokine is present in normal human plasma and is increased in heart failure”
Biochem Biophys Res Commun. 1999; 261: 567-571.

Teiger E, Dam TV, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P (1996)

“Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat”
J. Clin. Invest. 97:2891-7.

The Task Force on Heart Failure of the European Society of Cardiology (1995)

“Guidelines for the diagnosis of heart failure”
Eur Heart J 1995;16:741-51.

Tian ZJ, Cui W, Li YJ, Hao YM, Du J, Liu F, Zhang H, Zu XG, Liu S, Chen L, An W (2004)
“Different contributes of STAT3, ERK1/2, and PI3-K signaling to cardiomyocyte hypertrophy by cardiotrophin-1.”

Acta Pharmacol Sin. 2004;25(9):1157-64.

Toh R, Kawashima S, Kawai M, Sakoda T, Ueyama T, Satomi-Kobayashi S, Hirayama S, Yokoyama M (2004)

“Transplantation of Ct-1-expressing myoblasts to the left ventricular wall alleviates the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats”

Am Coll of Cardiology 2004; 43:2337-47.

Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, Ivannikova TA, Smirnova EA, Raikhlin ET (1995)

“Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus”
J Virol. 1995 Feb;69(2):1181-9.

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL (1996)

“Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart”
Circulation 1996;93:704-11.

Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, Mabuchi N, Sawaki M, Kinoshita M (1998)

“IL-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of IL-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure”

J Am Coll Cardiol 1998;31:391-398.

Tucholski J, Lesort M, Johnson GV (2001)

“Tissue transglutaminase is essential for neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells”

Neuroscience. 2001;102(2):481-91.

Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Levy D (1997)

“Left ventricular dilatation and the risk of congestive heart failure in people without myocardial infarction”

N Engl J Med 1997;336:1350-5.

Warner HR (1997)

“Aging and regulation of apoptosis”

Curr. Top. Cell. Regul. 35:107-121.

Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN (2003)

“A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure”

J. Clin. Invest. 2003;111:1497-1504.

Wessely R, Henke A, Zell R, Kandolf R, Knowlton KU (1998a)

“Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture“

Circulation 1998;98:450-45.

Wessely R, Klingel K, Santana LF, Dalton N, Hongo M, Lederer WJ, Kandolf R, Knowlton KU (1998b)

“Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy“

J. Clin. Invest. 1998. 102:1444-1453.

Wieczorek SJ, Wu AHB, Christenson R, Krishnaswamy P, Gottlieb S, Rosano T, Hager D, Gardetto N, Chiu A, Bailly KR, Maisel A (2002)

“A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure: A multicenter evaluation“

Am Heart J 2002;144:834-9.

Wollert KC et Chien KR (1997)

“Cardiotrophin-1 and the role of gp130-dependent signaling pathways in cardiac growth and development“

J. Mol. Med. 75: 492-501.

Wollert KC, Taga T, Saito M, Narazaki M, Kishimoto T, Glembotski CC, Vernallis AB, Heath KJ, Pennica D, Wood WI, Chien KR (1996)

“Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy“

J Biol Chem 271:9535-9545 (1996)

Woodruff JF (1980)

“Viral myokarditis: a review“

Am J Pathol 101:425-484

Wyllie AH (1994)

“Death gets a brake“

Nature 1994;369:272-3.

Wyllie AH (1987)

“Apoptosis cell death in tissue regulation“

J Pathol 1987;153:313-6.

Yamamura T, Nakamura H, Yamamoto T, Umemoto S, Fujii T, Kobayashi N, Matsuzaki M (1999)

“Fas expression and apoptosis correlate with cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy“

Jpn Circ J 1999;63:149-54.

-
- Yasuda M, Umemura S, Osamura RY, Kenjo T, Tsustumi Y (1995)
“Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method”
Arch Histol Cytol. 1995;2:185-90.
- Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, Nakamura T, Pradervand S, Hanada T, Hanakawa Y, Yoshimura A, Ross J, Chien KR (2001)
“Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways”
J Clin Invest, 2001;108(10):1459-1467.
- Yoshida K, Tetsuya T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T (1996)
“Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders”
Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93,407-411 (1996).
- Zolk O, Ng LL, O’Brien RJ, Weyland M, Eschenhagen T (2002)
“Augmented Expression of Cardiotrophin-1 in Failing human hearts is accompanied by diminished glycoprotein 130 receptor protein abundance”
Circulation 106 (12): 1442

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kristina Hilbig
Geboren am	16.12.1977 in Nordhorn
Wohnort	Sophienstr. 22A in 10317 Berlin

Schulausbildung

1984 – 1990	Grundschule und Orientierungsstufe, Nordhorn
1990 – 1997	Gymnasium Nordhorn, Abschluss Abitur

Studium der Humanmedizin

Oktober 1997	Beginn des Studium an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
September 1999	Ärztliche Vorprüfung, FSU Jena
August 2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, FSU Jena Anschließend Beginn der Promotionsarbeit
August 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, FSU Jena
April 2003	Beginn des Praktischen Jahres 1. Tertial Pädiatrie, Academisch Ziekenhuis Groningen (AZG) Niederlande 2. Tertial 8 Wochen Kinderchirurgie, AZG 8 Wochen Chirurgie, Helios Klinikum Erfurt 3. Tertial Innere Medizin, Klinikum Oldenburg
Juni 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, FSU Jena

Ärztliche Tätigkeit

01.09.2004 – 31.12.2006	Ärztin in Weiterbildung, Kinderklinik Nordhorn
Seit dem 1. Januar 2007	Ärztin in Weiterbildung, Klinikum Frankfurt (Oder)

Danksagung

Ich danke Dr. med. Friedhelm Kütke für die Betreuung der Arbeit, verbunden mit vielen anregenden Diskussionen, der kritischen Auseinandersetzung und Hilfestellung bei der Auswertung der Ergebnisse und der mühsamen Durchsicht des Manuskripts.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H. R. Figulla für die Möglichkeit danken, dass ich die Arbeit in seiner Klinik anfertigen durfte.

Besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. G. F. Jirikowski und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung bei den Apoptosefärbungen und die Möglichkeit diese im Labor der Anatomie auszuwerten bedanken. Seine sowohl fachlichen als auch persönlichen Anregungen haben mir während dieser Zeit sehr geholfen.

Mein herzlicher Dank gilt der gesamten kardiologischen Arbeitsgruppe der Klinik für Innere Medizin in Jena, die sowohl während meiner Labortätigkeit als auch danach immer mit herzlichem Rat und oft mit Tee und Gebäck zur Seite stand. Insbesondere gilt mein Dank hier Martina Lätz für die kompetente und liebevolle Betreuung bei meinen ersten Versuchen im Labor, die Anfertigung der Apoptosefärbungen und die große moralische Unterstützung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Stephan Fengler für die Einarbeitung in das ImageJ Programm, seine Aufmunterung und die vielen Anregungen und Hilfestellungen bei jeglichen Computerproblemen.

Hubert Kasperczyk danke ich für die Zeit in Jena und die mühevollen Korrekturen dieser Arbeit. Ihm, der kurz vor dem Abschluss seiner biochemischen Doktorarbeit verstorben ist, widme ich diese Dissertation.

Nicht genug danken kann ich meiner Familie und meinem Freund Bastian ganz einfach dafür, dass sie immer für mich da sind.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in dieser Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. med. F. Küthe, Prof. Dr. med. G.F. Jirikowski und Frau A. Brandstädt,
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen für mich für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Arbeit noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort und Datum

Unterschrift